



Mariana Balsa dos Santos

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Estudo de biomarcadores e de novas
terapias na tumorigénese e metastização
do cancro do cólon e do reto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Maria Cristina Mantas Albuquerque
Valeroso, Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular
(UIPM), Instituto Português de Oncobiologia de Lisboa
Francisco Gentil, EPE (IPOLFG)

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardes
Gonçalves, Universidade Nova de Lisboa
Arguente: Professor a Doutora Maria Luísa Santos de Sousa Cyrne, Universidade
de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018

Mariana Balsa dos Santos

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Estudo de biomarcadores e de novas
terapias na tumorigénese e metastização
do cancro do cólon e do reto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Maria Cristina Mantas Albuquerque
Valeroso, Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular
(UIPM), Instituto Português de Oncobiologia de Lisboa
Francisco Gentil, EPE (IPOLFG)

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardes
Gonçalves, Universidade Nova de Lisboa
Arguente: Professora Doutora Maria Luísa Santos de Sousa Cyrne, Universidade
de Lisboa

Setembro 2018

Estudo de biomarcadores e de novas terapias na tumorigénese e metastização do cancro do cólon e do reto

Copyright Mariana Balsa dos Santos, FCT/UNL, UNL

Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Um grande obrigado a todos os que me acompanharam nesta jornada interminável, pela ajuda, pelo carinho e a amizade que foram essenciais para a conclusão desta etapa.

Agradeço em primeiro lugar à Dra Cristina Albuquerque, pela oportunidade de participação no projeto de investigação, pela sua orientação assim como pelos conhecimentos transmitidos. Pela dedicação e confiança depositada em mim.

Ao Dr. Bruno Filipe, por todo o apoio e ajuda em qualquer questão no laboratório, pelas gargalhadas e amizade.

À Mestre Inês Francisco que sempre se demonstrou disponível para ajudar e que me ensinou várias técnicas laboratoriais, pela transmissão de conhecimentos e pelo apoio na revisão desta tese e à Doutoranda Patrícia Silva por toda a ajuda, aprendizagem e pela simpatia.

À Doutora Branca Cavaco, Coordenadora da unidade de Investigação em Patobiologia Molecular, do Instituto Português de Oncologia, Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E, por me ter concedido a oportunidade de participar neste projeto.

Ao Serviço de Gastrenterologia, Clínica de Risco familiar e ao Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia, Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E, pela disponibilização do material biológico e informação clínica dos doentes.

À Dra Patrícia Machado, Dra Sidónia Santos e em especial à Dra Sofia Fragoso pelas conversas, pelas gargalhadas e acima de tudo pelo apoio prestado.

Aos restantes membros da Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular, que sempre me ajudaram, pela simpatia e acolhimento.

Às minhas colegas de laboratório, Marlene Duarte, Teresa Duarte, Patrícia Valentim, Íris Guerreiro e Lucília Pereira que sem elas nada disto teria sido igual. Um grande obrigado pela amizade, pelo carinho e pela entreaajuda.

À Marlene por toda ajuda, pelo carinho, pela amizade e confidencialidades.

À Teresa Duarte, pela amizade e pela força transmitida. Pelas gargalhadas e também confidencialidades.

À Patrícia Valentim, minha companheira de licenciatura, mestrado e ainda de laboratório, por teres sido um dos meus grandes apoios e por toda a amizade. Pela companhia de comboio, pelas gargalhadas, confidencialidades, por todos os lugares “roubados” e pelos bilhetinhos. Sem ti nada disto teria sido o mesmo, foste um dos pontos focais para que esta jornada chegasse ao fim.

À Iris Guerreiro, companheira de bancada, pela ajuda e acima de tudo pela organização e pelas “pontas emprestadas”. Sem ti nada disto teria sido igual, um grande obrigado pela amizade, pelas confidencialidades, pelas gargalhas e por me teres aturado em momentos difíceis.

À Lucília Pereira, por toda a ajuda, não só em termos laboratoriais como na correção desta dissertação. Pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência e dedicação, um obrigado também por toda a simpatia e amizade.

Ao António, nem sei por onde começar, foste um dos grandes apoios e sem ti tudo teria sido bem mais difícil. Obrigada pela força, pela motivação, por todo o carinho e apoio que me deste e acima de tudo pelos sorrisos que me tiraste mesmo nos momentos de mais *stress*.

Por fim, quero agradecer aos meus pais, que sem eles nada disto teria sido possível. Obrigada por todo o carinho e apoio, por todos os abraços e todos os “vais conseguir”. Não há palavras para descrever o quão grata vos estou por toda a paciência e amor que depositaram em mim

Abstract

Colon and rectal cancer (CCR) is one of the most lethal cancers, mainly due to resistance to therapies and late diagnosis. Thus, the development of new therapies and the identification of biomarkers is imperative.

TCF7L2 (*transcription factor 7 like2*) is an important component of the Wnt pathway, mutations in this gene are associated with CCR. In this study, we analyzed the genotype of polymorphisms located in the promoter region, in individuals with CCR. The results point to a correlation between homozygosity for the normal allele, and familial risk.

The *TCF7L2* gene has several alternative splicing sites in this study, the expression of the 1-2, 3-4, 3-5 and 7-8 junctions and the genotype of 4 polymorphisms located in introns 4 and 5. The results did not demonstrate a correlation between the genotype of the polymorphisms and the change in the expression of isoforms, but they appeared to demonstrate a correlation between expression of isoforms without exon 4 and increased likelihood of relapse.

In order to understand if isoforms with replicate exons of the *TCF7L2*, *PROM1* and *CD44* genes could correspond to the circular RNA (circRNA), PCR amplification was performed by specific primer pairs, exon junctions of these genes. Although the results suggest the existence of circRNA, more studies are needed.

In order to target treatment for different CCR subtypes, the response of the CCR, LoVo and SW480 cell lines to different compounds was evaluated. A significant anti-proliferative effect of nutraceuticals has been observed, which may help to overcome the drug resistance in effect. The results point to the need to adopt more personalized therapeutic strategies, i.e. more targeted to the tumor subtype. Gant61 was highlighted for the treatment of subtypes of tumors represented by LoVo and azacitidine for those represented by SW480.

Keywords: CCR, *TCF7L2*, isoforms, circRNA, SW480, LoVo

Resumo

O cancro do cólon e do reto (CCR) é um dos cancros mais letais, principalmente devido à resistência às terapias e diagnóstico tardio. Assim, é imperativo o desenvolvimento de novas terapias e identificação de biomarcadores.

O *TCF7L2* (*transcription factor 7 like2*) é um importante componente da via Wnt, mutações neste gene estão associadas ao CCR. Neste estudo, foi analisado o genótipo de polimorfismos localizados na região promotora, em indivíduos com CCR. Os resultados apontam para uma correlação entre a homozigotia para o alelo normal, com o risco familiar.

O gene *TCF7L2* tem vários locais de *splicing* alternativo neste estudo, analisou-se, através de RT-qPCR a expressão das junções 1-2, 3-4, 3-5 e 7-8 e o genótipo de 4 polimorfismos localizados nos intrões 4 e 5. Os resultados não demonstraram uma correlação entre o genótipo dos polimorfismos e a alteração da expressão de isoformas, mas pareceram demonstrar uma correlação entre a expressão de isoformas sem o exão 4 e o aumento da probabilidade de recidivar.

Com o objetivo de perceber se isoformas com repetição de exões dos genes *TCF7L2*, *PROM1* e *CD44*, poderiam corresponder a RNA circular (circRNA), amplificou-se por PCR, através de pares de *primers* específicos, junções de exões destes genes. Embora os resultados sugiram a existência de circRNA é necessária a realização de mais estudos.

A fim de direcionar o tratamento para diferentes subtipos de CCR, avaliou-se a resposta das linhas celulares de CCR, LoVo e SW480 a diferentes compostos. Observou-se um efeito anti-proliferativo significativo dos nutracêuticos, que podem vir a ajudar a superar a resistência aos fármacos em vigor. Os resultados apontam para a necessidade da adoção de estratégias terapêuticas mais personalizadas, i.e. mais orientadas para o subtipo de tumor. Destacando-se o Gant61 para o tratamento de subtipos de tumores representados pela LoVo e a azacitidina para os representados pela SW480.

Palavras-chave: CCR, *TCF7L2*, isoformas, circRNA, SW480, LoVo

Índice Geral

1	Introdução	1
1.1	Cancro do colon e do reto	1
1.2	Sequencia adenoma carcinoma	1
1.3	Síndromes hereditárias do CCR.....	3
1.3.1	Síndromes associadas a polipose	3
1.3.2	Polipose associada ao gene <i>MUTYH</i>	4
1.3.3	Polipose hamartomatosa	4
1.3.4	Polipose Serreada.....	4
1.4	Cancro do cólon e do reto hereditário não associado a polipose	5
1.4.1	Síndrome de Lynch	5
1.4.2	Cancro do cólon e do reto familiar do tipo X.....	7
1.5	Via de sinalização Wnt	7
1.6	Identificação de marcadores de prognóstico.....	8
1.6.1	Gene <i>TCF7L2</i>	9
1.7	RNAs circulares e o CCR	10
1.8	Terapias no cancro do cólon e do reto	12
1.8.1	Modificadores epigenéticos.....	12
1.8.2	Inibidores da via de sinalização <i>Hedgehog</i>	13
1.8.3	Nutracêuticos	13
1.9	Estudos Prévios.....	14
1.10	Objetivo.....	16
2	Métodos	17
2.1	Material Biológico	17
2.2	Extração de ácidos nucleicos	18
2.2.1	Extração de DNA	18
2.2.2	Extração de RNA	18
2.3	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	19
2.3.1	Otimização das condições de reação de PCR	19
2.3.2	Amplificação de cDNA/DNA genómico por PCR	20
2.3.3	Eletroforese em gel de agarose	20

2.4	Sequenciação de Sanger	20
2.4.1	Purificação dos produtos amplificados por PCR.....	21
2.4.2	Reação de sequenciação.....	21
2.4.3	Precipitação e purificação do DNA após reação de sequenciação	21
2.4.4	Preparação das amostras para eletroforese capilar no sequenciador automático 22	
2.4.5	Análise de resultados	22
2.5	Reação de transcrição reversa para síntese de cDNA	22
2.6	PCR quantitativo.....	23
2.6.1	Otimização das condições da reação de qPCR	24
2.7	Análise de formas de circRNA dos genes <i>CD44</i> , <i>PROM1</i> e <i>TCF7L2</i>	24
2.8	Análise de polimorfismos do gene <i>TCF7L2</i>	25
2.9	Análise de expressão de junções do gene <i>TCF7L2</i>	26
2.10	Cultura celular.....	26
2.10.1	Linhas celulares	26
2.10.2	Subcultura celular	27
2.10.3	Criopreservação celular	27
2.10.4	Descongelamento celular	27
2.10.5	Contagem de células	28
2.10.6	Ensaio de viabilidade celular.....	28
2.10.7	Ensaio de migração celular	29
2.11	Análise da expressão de genes envolvidos na <i>stemness</i> , EMT e vias de sinalização específicas 30	
2.12	Análise estatística.....	30
3	Resultados e discussão.....	31
3.1	Análise do genótipo de polimorfismos do gene <i>TCF7L2</i> , em indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda, associado ao risco familiar.....	31
3.2	Análise do genótipo de polimorfismos do gene <i>TCF7L2</i> , em indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTX- <i>like</i> e linhas celulares CCR, como um fator de impacto na expressão de isoformas 36	
3.3	Papel das isoformas sem o exão 4 do gene <i>TCF7L2</i> no CCR	42
3.4	Potencial papel da expressão de RNAs circulares (circRNA) específicos no CCR..	45

3.5	Estudo de terapias com capacidade anti-proliferativa em duas linhas celulares de CCR representativas de subtipos tumorais distintos	52
3.6	Estudo de terapias com capacidade anti-migratória/anti-metastática em duas linhas celulares de CCR representativas de subtipos tumorais distintos	56
3.7	Análise da expressão de marcadores envolvidos na tumorigênese e progressão tumoral do CCR	62
3.8	Novas terapias em perspectiva: contornar a citotoxicidade em células normais e potenciar os efeitos terapêuticos nas células tumorais	68
4	Conclusão	69
5	Bibliografia	73
6	Anexos	79

Índice figuras

Figura 1.1 – Sequência adenoma-carcinoma	2
Figura 1.2 – Síndromes hereditárias de CCR	3
Figura 1.3- Representação esquemática da via WNT/ β -catenina	8
Figura 1.4 - Representação esquemática do gene <i>TCF7L2</i> e respetiva proteína	9
Figura 1.5 - (A) – Organização exónica de 13 isoformas conhecidas de transcritos do gene <i>TCF7L2</i> , as barras vermelhas indicam os locais de STOP para cada uma das isoformas. (B) - Representação esquemática dos produtos proteicos comumente detetáveis assim como de duas formas dominantes negativas do gene <i>TCF7L2</i>	10
Figura 1.6 - Representação esquemática do <i>splicing</i> de circRNA.....	11
Figura 2.1 – Representação gráfica das fases do qPCR.....	23
Figura 2.2 – Esquema representativo da direção dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR de cDNA circular e cDNA linear.....	25
Figura 2.4 - Representação esquemática da localização dos polimorfismos do gene <i>TCF7L2</i> analisados neste estudo.....	26
Figura 2.3 - Esquema representativo da posição dos primers utilizados para amplificação de circRNA dos genes (A) – <i>TCF7L2</i> , (B) – <i>CD44</i> e (C) – <i>PROM1</i>	25
Figura 2.5 - Esquema da câmara de Neubuer	28
Figura 3.1 - Imagem representativa da análise do polimorfismo rs3814570 do gene <i>TCF7L2</i> , na amostra extraída de sangue periférico (CAS2526s) e na amostra extraída de tumor incluído em parafina (CAS2525) de um indivíduo que preencheu pelo menos um dos critérios de Bethesda.	36
Figura 3.2 - Análise de expressão por RT-qPCR do gene <i>TCF7L2</i> utilizando os <i>primers</i> para as junções dos exões 1-2, 3-4, 3-5 e 7-8 em RNA extraído de sangue periférico de indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTX-like.	40
Figura 3.3 - Imagem representativa da análise dos polimorfismos estudados do gene <i>TCF7L2</i> , localizados nos intrões 4 e 5, nas linhas celulares de CCR, LoVo, HT29, SW48, HCT116 e SW480.	41
Figura 3.4 - Análise de expressão por RT-qPCR do gene <i>TCF7L2</i> utilizando os <i>primers</i> para as junções dos exões 1-2, 3-4, 3-5 e 7-8 em RNA extraído de sangue periférico de indivíduos com CCR estágio III (A) - que recidivaram, (B) – que não recidivaram.....	44
Figura 3.5 - Representação esquemática das formas de circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene <i>TCF7L2</i> , identificadas após amplificação, utilizando os primers 5F-4R em cDNA extraído da linha celular de CCR HT29. As sequências dos primers usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo V.	46
Figura 3.6 - Representação esquemática de formas de circRNA compreendendo os exões 4 e 5 e parte do intrão 4 do gene <i>TCF7L2</i> após amplificação utilizando os primers 5F-Int4R em cDNA extraído da linha celular de CCR HT29.....	46
Figura 3.7 - Padrão eletroforético correspondente à análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene <i>TCF7L2</i> , utilizando os primers 5F-4R em cDNA.	48

Figura 3.8 - Padrão eletroforético correspondente à análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 1 e 2 do gene <i>CD44</i> utilizando os primers 2F-1R.....	49
Figura 3.9 - Padrão eletroforético correspondente à análise por electroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene <i>PROM1</i> utilizando os primers 5-4F e 4R.....	50
Figura 3.10 - Padrão eletroforético correspondente à análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene <i>PROM1</i> utilizando os primers 5F-4R.....	51
Figura 3.11 - Padrão eletroforético correspondente à análise por electroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA dos genes (A) - <i>CD44</i> e <i>PROM1</i> (B) - <i>TCF7L2</i> para a linha celular de CCR HT29 em cultura 2D e em cultura 3D (esferóide recolhido ao 7º dia de cultura)	52
Figura 3.12 - Representação esquemática do efeito de compostos citostáticos na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480.....	54
Figura 3.13 - Representação esquemática do efeito de moduladores específicos de vias de sinalização na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480.	55
Figura 3.14 - Representação esquemática do efeito de nutracêuticos na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480	55
Figura 3.15 - Representação esquemática do efeito de Inibidores de histona desacetilase e de DNA metiltransferase, na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480..	56
Figura 3.16- Fotografias representativas dos resultados do ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR SW480 após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h.	58
Figura 3.17 - Ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR SW480 após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h.....	59
Figura 3.18 - Fotografias representativas dos resultados do ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR LoVo após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h. 0h – correspondem ao dia em que se realizou o risco.	61
Figura 3.19 - Ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR LoVo após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h.....	62
Figura 3.20 - Análise de expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas no ciclo celular (<i>CDKN1A</i> , <i>CCNA2</i>), carácter estaminal (<i>LGR5</i> , <i>PROM1</i>), EMT (<i>CDH1</i> <i>VIM</i> , <i>SNAIL</i> , <i>ZEB1</i>), vias de sinalização SHH (<i>GLI1</i> , <i>PTCH1</i> , <i>VAX</i>) e TGF- β (<i>TGFβ1</i>) por RT-qPCR após tratamento da linha celular LoVo com fármacos citoestáticos (Irinotecano, Oxaliplatina e 5-FU) e com o inibidor da via de sinalização SHH (GANT61).	66
Figura 3.21 - Análise de expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas no ciclo celular (<i>CDKN1A</i> , <i>CCNA2</i>), carácter estaminal (<i>LGR5</i> , <i>PROM1</i>), EMT (<i>CDH1</i> <i>VIM</i> , <i>SNAIL</i> , <i>ZEB1</i>),	

vias de sinalização SHH (<i>GLI1</i> , <i>PTCH1</i> , <i>VAX</i>) e TGF- β (<i>TGFβ1</i>) por RT-qPCR após tratamento da linha celular SW480 com fármacos citoestáticos (Irinotecano, Oxaliplatina e 5-FU) e com o inibidor da via de sinalização SHH (GANT61).	68
Figura 6.1	91

Índice de Tabelas

Tabela 1.1– Critérios de Amesterdão I e II.....	5
Tabela 1.2 - Critérios de Bethesda.....	6
Tabela 1.3 – Características associadas a linhas celulares de CCR.	15
Tabela 2.1 - Genótipo dos polimorfismos analisados, localizados na região <i>upstream</i> do exão 1, em tumores e respetiva mucosa normal de indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda e indivíduos com CCR esporádico.....	30
Tabela 3.1- Genótipo dos polimorfismos analisados, localizados na região <i>upstream</i> do exão 1, em tumores e respetiva mucosa normal de indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda e indivíduos com CCR esporádico.....	34
Tabela 3.2 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos, localizados upstream do exão 1, do gene TCF7L2 para os indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda (doentes CB), para doentes com CCR esporádico, para indivíduos controle da população portuguesa, assim como para a frequência na população Ibérica, europeia e mundial.	35
Tabela 3.3 - Frequência do genótipo para o haplotipo correspondente aos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 nos doentes que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda (doentes CB).	35
Tabela 3.4 - Genótipo dos polimorfismos analisados, localizados na região <i>upstream</i> do exão 1 e nos intrões 4 e 5, em indivíduos índice de famílias FCCTX ou FCCTX-like (critérios Bethesda 4 e 5) e nas linhas de CCR em estudo.	37
Tabela 3.5 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos, localizados upstream do exão 1 e nos intrões 4 e 5 do gene <i>TCF7L2</i> para os indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTC-like, assim como a frequência na população Ibérica, europeia e mundial.....	39
3.6 - Valores de IC50 para os fármacos: 5-FU - 5-Fluoruracilio; Iri – Irinotecano; Cap – Capmatinib; Gant61; Aza – Azacitdina; Sulf. - Sulfurafano e OPE - Orange peel extract nas linhas celulares de CCR LoVo e SW480. - – Não foi possível determinar o valor de IC50.	54
Tabela VII.6.1 – Genótipo obtido para os polimorfismos analisados, localizados na região upstream do exão 1 e nos intrões 4 e 5, em indivíduos índice de famílias FCCTX ou FCCTX-like (critérios Bethesda 4 e 5).	91

Lista de Abreviações

5-FU	5-Fluorouracil
AFAP	<i>Attenuated familial adenomatous polyposis</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Aza	Azacitidina
BER	Sistema de reparação por excisão de bases
BMPR1A	<i>Bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CA	Critérios de amsterdão
CB	Critérios de Bethesda
CCR	Cancro do cólon e do reto
CD44	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>
CIN	Via de instabilidade cromossómica
CircRNA	RNA circular
DNMT	Metiltransferase de DNA
DVL	<i>Disheveled</i>
EMT	Transição epitelial mesenquimal
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FAP	Familiar adenomatous polyposis
FCCTX	Cancro do cólon e do reto familiar tipo X
FP	Flavonas polimetoxiladas
GLI1	<i>human glioma-associated oncogene homolog 1</i>
GLI2	<i>human glioma-associated oncogene homolog 2</i>
HDAC	Histona desacetilase
HMG	<i>high mobility group</i>
HNPCC	Cancro do cólon e do reto hereditário não associado a polipose
ITC	Isotiocianato
JPS	Síndrome polipose juvenil
KRAS	<i>Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
LS	síndrome de Lynch
MAP	<i>MUTYH associated polyposis</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH	DNA mutS homolog

MSI	Instabilidade de microssatélites
MSI-H	Instabilidade de microssatélites de alto grau
MSI-L	Instabilidade de microssatélites de baixo grau
MSS	microssatélite estável
MUTHY	<i>mutY homolog (E. coli)</i>
OPE	Estrato de casca de laranja
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PJS	Síndrome Peutz-Jeghers
PMS2	<i>PMS1 homolog 2</i>
PROM1	<i>prominin 1</i>
PS	Polipose serreada
Pygo	<i>Pygopus</i>
RBPS	Proteínas de ligação a RNA
SF	Sulfurafano
SMAD 2	<i>mothers against decantaplegic homolog 2</i>
SMAD 4	<i>mothers against decantaplegic homolog 4</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7 like 2</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
ccRNA	RNA de competição endógeno
lnc-RNA	RNA não codificante grandes
mCCR	Cancro do cólon e do reto metastático
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
ncRNA	RNA não codificante
sncRNA	RNA não codificante pequenos

1 Introdução

1.1 Cancro do colon e do reto

O cancro do colon e do reto (CCR) apresenta uma elevada taxa de mortalidade, sendo o quarto cancro com mais mortes e o terceiro mais frequente a nível mundial, em Portugal é o segundo cancro com a maior incidência (Arnold *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2016). Um dos principais fatores associados à alta mortalidade deve-se à resistência às terapias em vigor, o que ocorre em cerca de 90% dos doentes com cancro metastático (Longley e Johnston, 2005).

A patogénese deste cancro é complexa e é influenciada por diversos fatores que podem incluir predisposição genética e fatores ambientais. Apesar do CCR ser comum a nível mundial tem especial incidência em países desenvolvidos e altamente industrializados, o que se deve especialmente a fatores ambientais (Aykan, 2015). Países como a Austrália, Nova Zelândia e Canadá têm o índice de CCR mais elevado comparativamente com a China, Índia e algumas zonas de África e América do Sul (Akhtar *et al.*, 2014). Dentro dos fatores ambientais que estão associados ao aumento do risco no CCR encontram-se: tabagismo, consumo de comidas processadas e carnes vermelhas e consumo de álcool. Outros fatores de risco incluem também a doença inflamatória intestinal, história familiar de CCR e idade. Existem também fatores que se encontram associados a uma diminuição do risco no CCR que incluem uma atividade física regular, medicamentos não esteroides anti-inflamatórios e consumo de vegetais e fruta (Johnson *et al.*, 2014).

Existem duas formas de CCR, a forma esporádica e a familiar e ambas são doenças geneticamente orientadas. A primeira resulta de mutações espontâneas sucessivas, ou alterações funcionais (epigenéticas), a segunda deriva de mutações na linha germinal que dão origem ao processo carcinogénico (Obuch e Ahnen, 2016). Os casos de CCR familiar correspondem aproximadamente a cerca de 25% a 35% dos casos, sendo que os correspondentes a uma hereditariedade mendeliana são mais raros e compreendem apenas 3% a 5%, exemplo destes casos são a síndrome de Lynch e a polipose adenomatosa familiar (Zambirinis, 2009).

A taxa de sobrevivência no CCR depende do estágio de desenvolvimento da doença na altura do diagnóstico sendo que normalmente para tumores localizados a taxa de sobrevivência ronda os 90%, enquanto no caso do CCR metastático (mCCR) a taxa de sobrevivência é aproximadamente 10% (Akhtar *et al.*, 2014). A identificação de novos biomarcadores é essencial para ajudar no diagnóstico precoce, tratamento e prognóstico do CCR (Das *et al.*, 2017).

1.2 Sequencia adenoma carcinoma

Um dos conceitos mais importantes na descrição da progressão do epitélio normal do cólon, passando por um estado intermedio de adenoma, em carcinoma é a sequência adenoma-carcinoma, também conhecida como via de instabilidade cromossómica (CIN) (figura 1.1). Este modelo foi descrito pela primeira vez por Fearon e Vogelstein em 1990 e descreve o aparecimento de tumores derivado da acumulação progressiva de mutações. As alterações genéticas envolvidas no processo de carcinogénese envolvem, normalmente, genes supressores de tumor, oncogenes ou genes de

reparação de DNA (Fearon e Vogelstein, 1990). A maior parte dos CCR ocorrem segundo esta via, sendo que a grande parte das alterações são aneuploidias e perdas de heterozigotia (*loss of heterozygosity* – LOH) que incluem por exemplo, os cromossomas 5q, 18q e 17p. Estas alterações cromossômicas podem resultar de defeitos na segregação cromossômica, instabilidade telomérica e em resposta a danos no DNA (Daly *et al.* 2018).

Apesar de ainda não se conhecer na totalidade os genes envolvidos nesta via, sabe-se que inicialmente ocorre a inativação das duas cópias do gene supressor de tumor *adenomatous polyposis coli* (*APC*), que se encontra localizado no cromossoma 5q. O produto do gene *APC* é uma proteína que apresenta múltiplos domínios funcionais que regulam vários processos celulares que incluem a diferenciação e migração. Um dos papéis mais importantes é a interação com a β -catenina, um componente essencial da via de sinalização Wnt, promovendo a sua degradação. De seguida ocorrem mutações ativadoras no oncogene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*), as quais são encontradas em 30% a 50% dos CCR. Posteriormente o processo carcinogénico continua através de mutações adicionais nos genes *transforming growth factor- β* (*TGF- β*), *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (*PIK3CA*) e *tumor protein p53* (*TP53*) (Leslie *et al.*, 2002). A progressão neoplásica está também associada à LOH no cromossoma 18q, identificada em cerca de 70% dos CCR, que compreende os genes supressores de tumor *mothers against decapentaplegic homolog* (*SMAD*) 2 (*SMAD2*) e *SMAD4*, que são mediadores intracelulares da via *TGF- β* que está envolvida na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose (Kumar *et al.*, 2015).

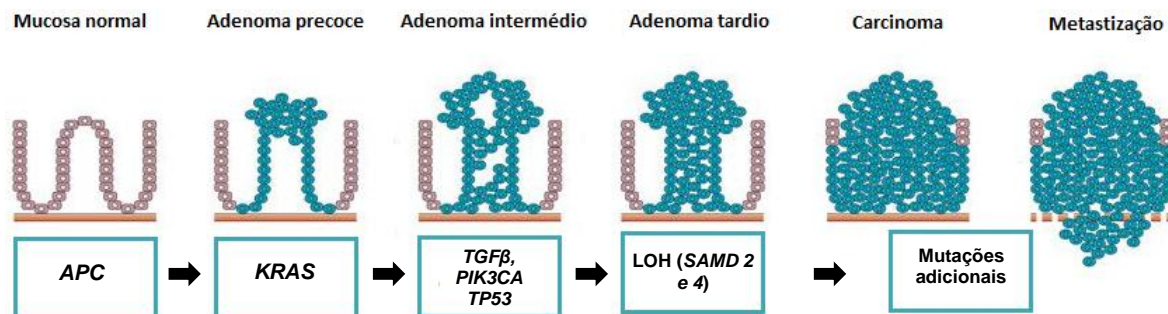


Figura 1.1 – Sequência adenoma-carcinoma (adaptado de: Davies *et al.*, 2005)

1.3 Síndromes hereditárias do CCR

É estimado que aproximadamente 30% de todos os CCR sejam uma forma familiar da doença e sabe-se que aproximadamente 5% dos casos estão associados a mutações herdadas em genes com alta penetrância. As síndromes hereditárias de CCR podem ser divididas em dois grupos, síndromes associadas a polipose e síndromes não associadas a polipose (figura 1.2). No entanto, a etiologia de 20 a 30% dos CCR herdados não é completamente compreendida, pensa-se que alterações em genes com menor penetrância (mais comuns que aqueles já associados a síndromes) possam estar por detrás destes casos. Exemplos incluem polimorfismos em genes que regulam o metabolismo ou genes que são regulados por fatores genéticos ou ambientais. Outra causa pode ser devida a alterações em múltiplos *loci* de suscetibilidade com efeitos aditivos (Jasperson *et al.*, 2010).

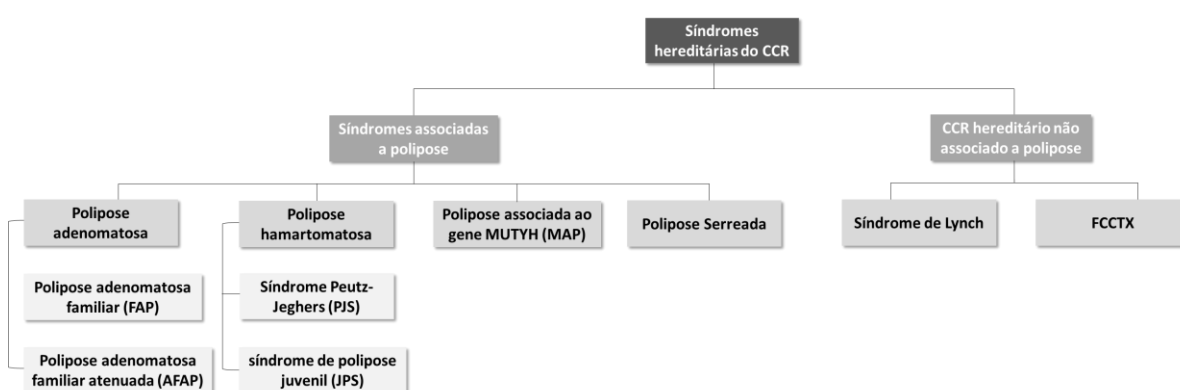


Figura 1.2 – Síndromes hereditárias de CCR

1.3.1 Síndromes associadas a polipose

1.3.1.1 Polipose adenomatosa familiar

A polipose adenomatosa familiar (*familial adenomatous polyposis* – FAP), uma condição hereditária dominante, é a segunda síndrome de CCR mais frequente e conta com uma prevalência de 1/10000 indivíduos. A maior parte dos doentes é assintomático durante anos e quando os sintomas aparecem são inespecíficos e por isso a progressão para o CCR é inevitável caso não sejam tratados. Cerca de 70% dos doentes apresenta uma história familiar de pólipos no colón e no reto assim como de CCR. A FAP pode dividir-se em dois fenótipos distintos: FAP clássica, caracterizada pelo desenvolvimento de centenas a milhares de adenomas, que têm início na adolescência; FAP atenuada (AFAP), caracterizada pelo aparecimento de um menor número de pólipos adenomatosos, idade de diagnóstico normalmente mais avançada e com um risco para desenvolvimento de CCR mais baixo. (Carballal *et al.* 2014; Half *et al.*, 2009; Jasperson *et al.*, 2010)

Tanto a FAP como a AFAP apresentam mutações germinais no gene *APC*, mutações que resultam usualmente de perda de função de um dos alelos, de mutações pontuais (um a poucos nucleótidos), assim como mutações que envolvem exões ou o gene todo. Associadas à forma clássica da FAP encontram-se mutações na extremidade 5' do exão 15 do gene *APC*, enquanto

mutações associadas às sequências iniciais dos exões 4 e 9 e à extremidade 3' do exão 15 do gene *APC* estão associadas à AFAP (Jasperson *et al.*, 2010).

1.3.2 Polipose associada ao gene *MUTYH*

A polipose associada ao gene *MUTYH* (*MUTHY-associated polyposis* – MAP) é uma condição hereditária recessiva causada por mutações bi-alélicas no gene *MUTYH*. Este gene faz parte do sistema de reparação por excisão de bases (BER), que está envolvido na reparação de danos oxidativos do DNA (Zambirinis *et al.*, 2009). A MAP é caracterizada por um ligeiro aumento do risco de desenvolver CCR, sendo que os pólipos adenomatosos são predominantes e os pólipos hiperplásicos são comuns. O diagnóstico pode ser baseado na história familiar, nos achados clínicos e colonoscopia mas é sempre necessário confirmar através de testes genéticos (Jasperson *et al.*, 2010).

1.3.3 Polipose hamartomatosa

A síndrome Peutz-Jeghers e a síndrome polipose juvenil são condições de polipose hamartomatosa que estão relacionadas com o aumento do risco de CCR (Carball *et al.*, 2014).

A síndrome Peutz-Jeghers (PJS) é caracterizada por lesões gastrointestinais e pólipos hamartomatosos, no intestino delgado presentes em aproximadamente 96% dos doentes. Para além disso, é possível encontrar pólipos gástricos ou no cólon em 20 e 30% dos doentes, respetivamente. É uma síndrome autossómica dominante que conta com mutações germinais no gene supressor de tumor *serine theonine kinase 11* (*STK11*) em 70% dos doentes, no entanto pensa-se que possam estar envolvidos outros genes na patogenicidade da doença (Hisamuddin e Yang, 2006). O diagnóstico clínico pode ser realizado quando um indivíduo apresenta 2 ou mais das seguintes condições: 2 ou mais pólipos hamartomatosos no intestino delgado; hiperpigmentação da mucosa cutânea; e história familiar de PJS (Jasperson *et al.*, 2010).

A síndrome de polipose juvenil (JPS) é uma doença autossómica dominante, causada por mutações germinais no gene *SMAD4* ou *bone morphogenetic protein receptor type 1A* (*BMPR1A*), ambos envolvidos na via de sinalização TGF- β (Carball *et al.*, 2014). O diagnóstico clínico da JPS é efetuado através da presença de pelo menos 3 pólipos juvenis no cólon, múltiplos pólipos juvenis no trato gastrointestinal, ou qualquer número de pólipos juvenis e uma história familiar da condição (Jasperson *et al.*, 2010).

1.3.4 Polipose Serreada

A polipose serreada (PS), anteriormente conhecida como polipose hiperplásica, é uma condição rara caracterizada pela presença de múltiplos pólipos serreados no cólon proximal e pelo aumento de risco de desenvolvimento de CCR. Sendo que, a idade média de diagnóstico varia entre os 50 e 60 anos (Guarinos *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017).

De acordo com os critérios de diagnóstico clínico da Organização Mundial de Saúde, o diagnóstico da PS tem em conta vários fatores incluindo, o número de tumores serreados, o tamanho

dos tumores, a história familiar de PS e localização dos tumores. O mecanismo molecular por detrás desta via ainda não é totalmente compreendido, no entanto um dos processos de carcinogénese parece ter início através de mutações ativadoras do oncogene *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (BRAF)*. (Guarinos *et al.*, 2012)

1.4 Cancro do cólon e do reto hereditário não associado a polipose

O cancro do cólon e reto hereditário não associado a polipose (HNPCC) é a forma familiar de CCR mais comum, compreendendo entre 2 a 3% de todos os casos. É uma síndrome hereditária autossómica dominante caracterizada pelo aumento do risco de vários tipos de cancro, particularmente, do cólon e do endométrio.

Em 1991, o *International Collaborative Group on HNPCC* (ICG-HNPCC) desenvolveu critérios clínicos conhecidos como Critérios de Amesterdão-I (CA-I) para o diagnóstico do HNPCC, os quais foram posteriormente revistos, em 1999, de modo a incorporar tumores extra colónicos, (Critérios de Amesterdão-II - CA-II) (tabela 1.1). (Vasen *et al.*, 1991; Vasen *et al.*, 1999).

Tabela 1.1– Critérios de Amesterdão I e II

Critérios de Amesterdão I (1991)	Critérios de Amesterdão II (1999)
1- Três ou mais parentes com CCR, onde um dos indivíduos deve ser parente em primeiro grau dos restantes;	1- Três ou mais parentes com cancro associado a HNPCC (CCR, cancro do endométrio, intestino delgado, uréter ou pélvis renal);
2- Pelo menos duas gerações afetadas;	2- Pelo menos duas gerações afetadas;
3- Pelo menos um dos casos de CCR deve ser diagnosticado antes da idade de 50 anos;	3- Pelo menos um dos casos de cancro deve ser diagnosticado antes da idade de 50 anos;
4- A polipose adenomatosa familiar (FAP) deve ser excluída.	4- A polipose adenomatosa familiar (FAP) deve ser excluída.

(adaptado de: Vasen *et al.* 1999)

O HNPCC é, então, definido pelo preenchimento dos critérios de Amesterdão e compreende duas síndromes, a síndrome de Lynch e o cancro do cólon e do reto familiar do tipo X (FCCTX). (Nieminen *et al.*, 2011; Wells e Wise, 2017; Zetner e Bisgaard, 2017).

1.4.1 Síndrome de Lynch

A síndrome de Lynch (LS) é uma das síndromes hereditárias mais comuns, que corresponde a 1 a 3% dos casos de CCR. A LS conta com condições específicas que incluem o aparecimento precoce de cancro, múltiplos tumores do cólon e do reto e ocorrência de tumores extra colónicos numa idade precoce (Carballal *et al.*, 2014; Tomita, 2018).

A LS tem uma transmissão autossómica dominante e é definida pela presença de mutações germinais num dos genes MMR: *MutL homolog 1 (MLH1)*, *DNA mutS homolog 2 (MSH2)*, *mutS homolog 6 (MSH6)* e *PMS1 homolog 2 (PMS2)*. A incidência de mutações identificadas nos genes

MMR é bastante diferente, sendo cerca de 80% no *MLH1* e *MSH2*, 10 a 12% no *MSH6* e 2 a 3% no *PMS2*. Parece existir uma correlação genótipo-fenótipo dependente do tipo de mutação: a presença de mutações no gene *MLH1* estão associadas a um maior risco de desenvolvimento apenas de CCR; a presença de mutações no gene *MSH2* aumenta o risco de desenvolvimento de CCR assim como de tumores extra colónicos; mutações no gene *MSH6* levam ao aumento do risco de desenvolvimento de CCR e particularmente de cancro do endométrio; mutações no gene *PMS2* parecem estar associadas a um menor risco de desenvolvimento de CCR e cancro do endométrio, assim como a uma idade de diagnóstico mais tardia (Byrne e Tsikitis, 2018). Recentemente, foram descritas deleções germinais na extremidade 3' do gene *Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)*, o qual se localiza a montante do *MSH2*, como estando associadas à LS, que levam à metilação somática da região promotora do gene *MSH2* promovendo, deste modo, a sua inativação (Ligtenberg *et al.*, 2008)

A inativação dos genes MMR acelera a acumulação de mutações espontâneas que consistem, maioritariamente, em deleções de bases e inserções em curtas sequências repetitivas de DNA, denominadas microssatélites. Estas alterações genéticas levam à instabilidade de microssatélites (MSI) e são encontradas na grande parte dos tumores (> 90%) de doentes com LS (Hegde e Roa, 2009). Desta forma, os tumores característicos de LS são também caracterizados por um elevado grau MSI.

Para além dos CA, em 1997 o *National Cancer Institute* desenvolveu os critérios de Bethesda (Tabela 1.2) (CB), os quais foram revistos em 2004, e que têm como objetivo identificar casos de LS em famílias que não cumprem os CA (Umar, *et al.*, 2004). Deste modo, os indivíduos são avaliados tendo em conta os critérios de Bethesda e, no caso de preencherem algum deles, é realizada a pesquisa de MSI no tumor (Boland e Goel, 2010). Esta pesquisa é realizada utilizando 5 marcadores de microssatélites (marcadores de Bethesda), dos quais, 2 são marcadores de mononucleótidos (BAT26 e BAT25) e 3 são marcadores de dinucleótidos (D2S123, D5S346 e D17S250). Quando um tumor apresenta instabilidade em apenas um dos marcadores, classifica-se como apresentando MSI de baixo grau (MSI-L), quando apresenta instabilidade em 2 ou mais marcadores, este apresenta MSI de alto grau (MSI-H). Quando não é observada instabilidade em nenhum destes marcadores diz-se que o tumor é microssatélite estável (MSS) (Boland e Goel, 2010; Wells e Wise, 2017).

Tabela 1.2 - Critérios de Bethesda

Critérios de Bethesda
1 - CCR diagnosticado num doente com idade inferior a 50 anos
2 - Presença de CCR síncrono, metacrónico ou outros tumores do espectro do LS, independentemente da idade
3 - Presença de CCR com histologia de MSI-H (presença de infiltrado linfocitário no tumor, reação Crohn-like, presença de muco e células em forma de sinete), diagnosticado num doente com idade inferior a 60 anos
4 - Presença de CCR num indivíduo com um ou mais familiares em primeiro grau com um tumor do espectro do HNPCC sendo que um dos tumores foi diagnosticado numa idade inferior a 50 anos
5 - Presença de CCR num indivíduo com dois ou mais familiares em primeiro ou segundo grau com um tumor do espectro do HNPCC, independentemente da idade

(adaptado de: Umar *et al.*, 2004)

1.4.2 Cancro do cólon e do reto familiar do tipo X

Para aproximadamente 40% das famílias, que preenchem os critérios de Amesterdão I, não foram detetadas alterações nos genes MMR, estas famílias são definidas como cancro do cólon e do reto familiar do tipo X (FCCTX). A síndrome FCCTX apresenta um fenótipo clínico substancialmente diferente das famílias com LS, uma vez que os tumores de FCCTX não apresentam instabilidade de microssatélites, apresentam uma menor incidência de CCR e uma baixa frequência de tumores extra cólicos (Lindor *et al.*, 2005). Comparativamente à SL, o desenvolvimento de CCR nos doentes com FCCTX ocorre mais tarde e com localização preferencial no cólon distal. Para além disso, estes doentes apresentam uma taxa de progressão adenoma-carcinoma mais lenta que nos doentes com LS (Francisco *et al.*, 2011; Lindor *et al.*, 2009).

Um estudo, realizado pelo grupo Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG), revelou duas entidades moleculares distintas para o FCCTX, uma, mais prevalente, onde os tumores apresentam LOH em genes supressor de tumor e mutações somáticas frequentes nos genes *APC* e *KRAS* (Francisco *et al.*, 2011).

Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos na tentativa de perceber a causa molecular desta síndrome, sendo que alguns autores encontraram alterações no gene *APC*, em tumores FCCTX, assemelhando-se às da LS, outros têm reportado alterações nas vias de sinalização RAS/RAF que são semelhantes às do CCR esporádico. Em adição, tem sido sugerido que as vias de reparação de excisão de bases, assim como eventos epigenéticos possam estar implicados no FCCTX (Sánchez-Tomé *et al.*, 2015).

Apesar da identificação clínica do FCCTX ter melhorado nos anos recentes, a sua etiologia genética permanece desconhecida. Vários estudos revelaram algumas regiões genómicas como candidatas, contudo, até à data, não foram identificados novos genes de suscetibilidade para o FCCTX sendo por isso necessário estudos adicionais na tentativa de caracterizar melhor esta síndrome e desenvolvimento de critérios de diagnóstico e terapêuticas. (Valle, 2014).

1.5 Via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt é categorizada nas vias de sinalização canónica (dependente de β -catenina) e não canónica (independente de β -catenina), sendo que a via canónica apresenta um papel essencial em diferentes fases de desenvolvimento tumoral incluindo proliferação celular, migração, invasão, tumorigénese e metastização (figura 1.3). Alterações nesta via estão relacionadas com o desenvolvimento de CCR.

Ao nível molecular, a via Wnt/ β -catenina regula os níveis citoplasmáticos e nucleares de β -catenina através de um complexo multiproteico de destruição que inclui o APC, Axina e GSK3 β . A Axina tem como função a estabilização do complexo mantendo-o ligado e, em conjunto com o APC, facilita a eficiência da fosforilação da β -catenina. Na ausência de ligandos Wnt, a β -catenina é sequestrada pelo complexo de destruição onde é fosforilada por GSK3 β e CK1. Posteriormente uma ubiquitina ligase E3, denominada β -TrCP, liga-se à β -catenina levando à ubiquitinação da mesma e consequentemente à degradação pelo proteossoma. Ao ser degradada não ocorre a sua

translocação para o núcleo e consequente ativação dos genes alvo (Bahrami *et al.* 2017; de Sousa *et al.* 2011).

Esta via é acionada através da ligação de ligandos Wnt a receptores LRP-5/6, família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein receptor*), e Frizzled, levando à ativação de Disheveled (DVL) que por sua vez recruta o complexo de destruição, sendo que se dá a libertação da β -catenina do mesmo. Isto leva a que a β -catenina acumule no citosol e migre para o núcleo onde interage com vários fatores de transcrição como o *T-cell factor* (TCF) e *lymphoid enhancer factor* (LEF) e co-ativadores como o *Pygopus* (Pygo) e Bcl-9. São ativados, assim genes alvo como *c-Myc*, que vão inibir a expressão genética do *p21* ativando o complexo ciclina/Cdk permitindo a entrada no ciclo celular da fase G1 para a S. Outro gene ativado diretamente pelo complexo TCF/ β -catenina é a ciclina D1. Exemplo de outros genes alvo ativados são: *MYC*, *CCD1*, *PPARD*, implicados na proliferação celular; *ASCL2* implicado no destino das células estaminais; *ABSB1*, *BIRC5*, implicados na sobrevivência; *ID2*, *ITF2*, *ENC1*, implicados na diferenciação; *MMP7*, *MMP14*, implicados na migração e *VEGF* implicado na angiogénese. (Bahrami *et al.* 2017; Herbst *et al.* 2014).

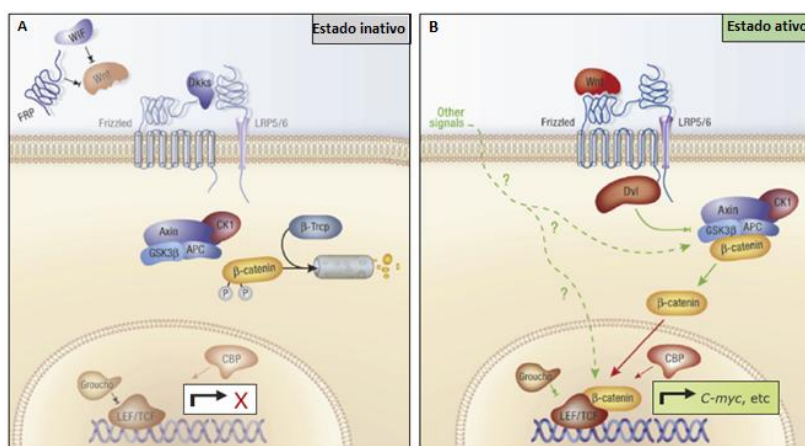


Figura 1.3- Representação esquemática da via WNT/ β -catenina

A – via inativa (ausência de ligando), B – via ativa (presença de ligando) (adaptado de: Albuquerque *et al.*, 2011).

1.6 Identificação de marcadores de prognóstico

Sendo o CCR um dos cancros mais frequentes a nível mundial e apesar de na última década a sobrevivência de doentes com CCR ter melhorado significativamente. Cada caso de CCR é diferente de doente para doente, tumores que se encontrem no mesmo estágio podem ter diferente prognóstico e diferente resposta à terapêutica. O mesmo se aplica para doentes com CCR metastático, que compreendem cerca de 50% dos doentes diagnosticados com CCR. Deste modo é importante a procura de biomarcadores de prognóstico e fatores preditivos de resposta à terapêutica capazes de direcionar o tratamento num processo cada vez mais personalizado (De Divitiis *et al.* 2014).

1.6.1 Gene *TCF7L2*

O gene *TCF7L2* (*transcription factor 7 like2*) codifica para um fator de transcrição que tem influência na transcrição de vários genes que exercem variadas funções celulares. Pertence à família TCF/LEF e contém um domínio altamente conservado denominado *high mobility group* (HMG) – box. Este gene compreende 17 exões, dos quais 5 demonstraram ser alternativos (exão 4 e exões 13-17).

O *TCF7L2* contém vários domínios: na extremidade N-terminal contém um local de ligação à β -catenina; um domínio que contém um motivo HGM-box; entre estes dois domínios encontra-se um domínio de interação com os corepressores Groucho/TLE que são proteínas de ligação a histonas e um domínio de localização nuclear (figura 1.4). A sua atividade transcricional é ativada pela β -catenina nuclear. Pode atuar como repressor ou como ativador de genes alvo da via de sinalização Wnt, sendo que a sua função varia dependendo da presença de domínios específicos derivados de isoformas diferentes. Tang *et al.* defende um modelo onde, simultaneamente, a ativação de *TCF7L2* e a inativação das proteínas TCF7L2, são necessárias para uma resposta transcricional ótima das proteínas da via de sinalização Wnt (Hecht e Stemmler 2003; Jin, 2016; Tang *et al.* 2008; Weise *et al.* 2010; Zhang e Lum 2018).

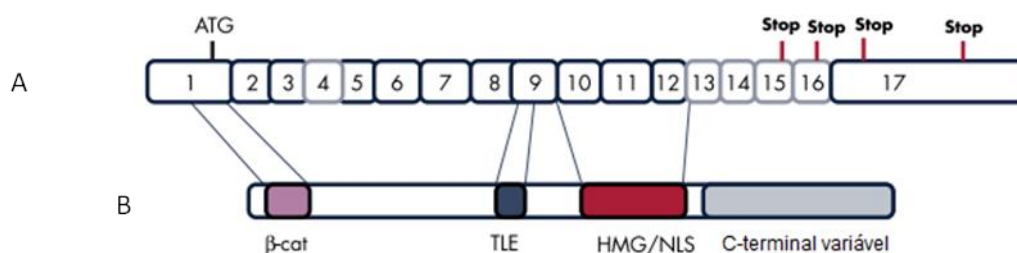


Figura 1.4 - Representação esquemática (A) do gene *TCF7L2* no qual estão representados os locais sujeitos a *splicing* alternativo (caixas a cizento), a posição do exão ATG (local de início da tradução) e as posições STOP utilizadas alternativamente estão indicadas e (B) da proteína *TCF7L2*, na qual estão representados os domínios (caixas). (adaptado de: Jin, 2016).

1.6.1.1 *Splicing* alternativo

Este gene tem vários locais de *splicing* alternativo que podem dar origem a diversas isoformas da proteína (figura 1.5). Existem 3 regiões do *TCF7L2* que estão mais sujeitas ao *splicing* alternativo: a primeira é no exão 4, que codifica para um domínio proteico constituído por 23 aminoácidos, e cujo *splicing* foi associado ao aumento da agressividade tumoral no carcinoma hepatocelular (Tomimaru *et al.*, 2014).; o segundo é no exão 8 que contém um local doador de *splicing* na extremidade 3' que leva à produção da isoforma TCF4N que tem um papel dominante negativo na via de sinalização Wnt não contendo a HMG-box; a terceira é nos exões 13-16, sendo que pode gerar as isoformas TCF4L, TCF4M e TCF4S com o C-terminal altamente divergente. Estudos recentes demonstram a existência de isoformas do *TCF7L2* em vários tipos de cancro incluindo o CCR, o cancro do cérebro e o cancro renal. Existem outras variações da sequência de mRNA do *TCF7L2* que são geradas devido a locais doadores e aceitadores de *splicing*,

respetivamente, nos exões 7, 8 e 9 que em conjunto podem dar origem a potenciais centenas de isoformas proteicas. (Hansson *et al.*, 2010; Mármol *et al.*, 2017; Weise *et al.*, 2010)

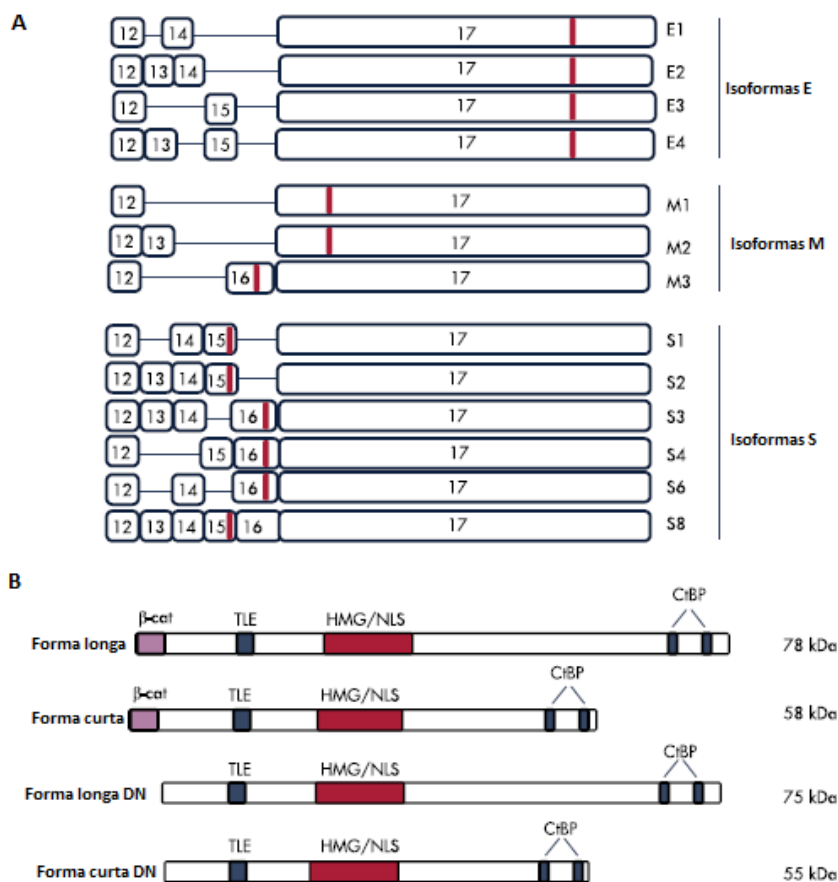


Figura 1.5 - (A) – Organização exônica de 13 isoformas conhecidas de transcritos do gene TCF7L2, as barras vermelhas indicam os locais de STOP para cada uma das isoformas. (B) - Representação esquemática dos produtos proteicos comunitários de duas formas dominantes negativas do gene TCF7L2 (forma longa DN e forma curta DN). Os domínios de ligação HMG / NLS, o domínio de ligação ao DNA e a localização nuclear estão representados. TLE e CtBP indicam domínios de interação com repressores transcricionais. (adaptado de: Jin, 2016))

1.7 RNAs circulares e o CCR

Na biologia tumoral, como referido anteriormente, é importante identificar novos potenciais biomarcadores, que são diferencialmente expressos entre tumores e o tecido normal. Com os avanços na tecnologia de sequenciação de RNA, cada vez mais RNA não codificantes, associados com a progressão tumoral, são descobertos. Estudos demonstraram que os RNA circulares (circRNA) estão muito associados com a iniciação e desenvolvimento do cancro. (Ji *et al.*, 2018; Xu *et al.* 2018).

O RNA não codificante (ncRNA) é dividido em ncRNA pequenos (sncRNA) e ncRNA longos (lncRNA), sendo que os lncRNA são constituídos por mais de 200 nucleótidos. O RNA circular representa uma nova categoria de ncRNA regulatórios, que foi recentemente identificada e parecem apresentar uma nova forma de regulação pós transcricional da expressão genética. Estes RNA são

formados por um processo conhecido como *back-splicing*, sendo que podem ocorrer em qualquer região genômica, incluindo zonas contendo genes e regiões intergênicas, e podem abranger desde poucas centenas a milhares de nucleótidos (figura 1.6) (Ji *et al.*, 2018; Vidal *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016)

Os circRNA diferenciam-se dos outros ncRNA pois apresentam as extremidades 5' e 3' covalentemente ligadas, que fazem com que não tenham extremidades terminais acessíveis, tornando-os resistentes à degradação por miRNA ou outras atividades exonucleótidas. Durante anos, não se percebeu bem o papel dos circRNA, sendo que pensava-se que não passavam de erros derivados de *splicing*. Foi a partir de 2012, que os circRNA, foram redescobertos e vários estudos apontam para que certos circRNA sejam altamente abundantes, endógenos, conservados, diversificados e que ocorrem naturalmente nas células eucarióticas (Ji *et al.*, 2018; Vidal *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018 Yang *et al.* 2016)

Os circRNA são predominantemente citoplasmáticos e exercem uma função, essencialmente, como RNA de competição endógenos (ccRNA), competindo com outros RNA pela ligação aos miRNA e de proteínas de ligação a RNA (RBPS), desta forma, conseguem modular a concentração local dos miRNA. (Vidal *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016).

Apesar da sua descoberta relativamente recente, vários estudos apontam para uma alteração na expressão destas moléculas em certas doenças humanas. Há evidências de que os circRNA estão associados aos miRNA envolvidos nas vias de sinalização relacionadas com o cancro e têm vindo a ser relacionados com a proliferação celular e algumas características clínicas como o tamanho do tumor e o aparecimento de metástases à distância. No CCR, há evidências da alteração destes circRNA, comparativamente aos tecidos normais. Tudo isto sugere o potencial papel dos circRNA não só como, biomarcadores de prognóstico como também de predição de terapias no cancro (Ji *et al.*, 2018; Vidal *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018; Yang *et al.* 2016).

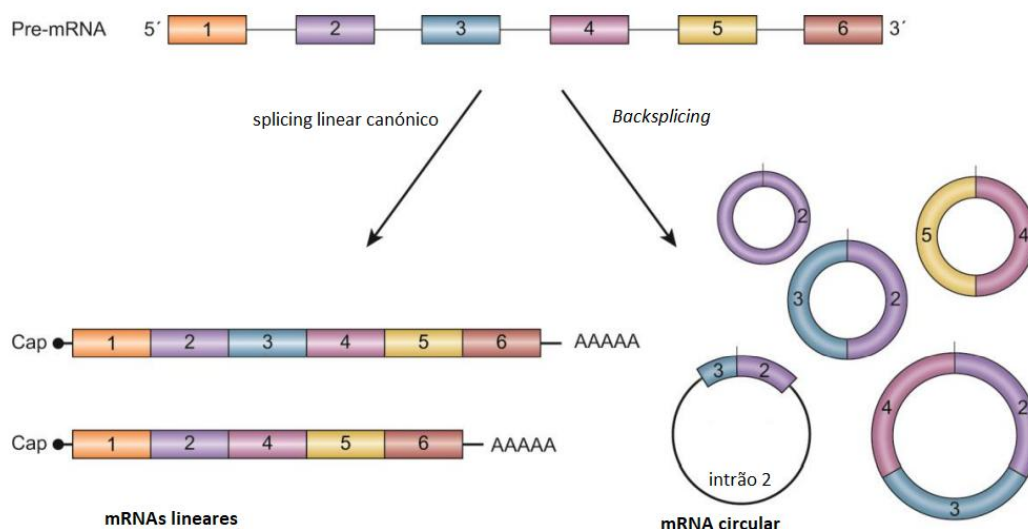


Figura 1.6 - Representação esquemática do splicing de circRNA. Os circRNAs são criados pelo processo de splicing não canônico conhecido como “backsplicing” (adaptado de: Huang *et al.*, 2017)

1.8 Terapias no cancro do cólon e do reto

O tratamento do CCR varia com o estágio da doença, sendo que a remoção do tumor e dos nódulos linfáticos adjacentes é o tratamento mais comum numa fase da doença ainda sem metástases à distância. Para doentes que se encontrem num estágio avançado, com metástases à distância, normalmente o tratamento consiste em quimioterapia em combinação antes ou depois da remoção cirúrgica do tumor e/ou das metástases caso sejam ressecáveis (Akhtar *et al.*, 2014).

A base da quimioterapia é a fluoropirimidina (FP) 5-Fluoruracilo (5-Fu) intravenoso ou FP capecitabina oral em várias combinações. Dentro da quimioterapia combinada temos: 5-Fu/Leucovorina(LV)/Oxaliplatina (FOLFOX), 5-Fu/LV/Irinotecano (FOLFIRI), 5-FU/Oxaliplatina/Irinotecano (FOLFOXIRI) e Capecitabina/Oxaliplatina (CABOX). O FOLFOX e o FOLFIRI apresentam uma atividade semelhante, no entanto apresentam toxicidades diferentes. A CABOX pode ser uma alternativa ao FOLFOX, pois tem um perfil de atividade e segurança semelhante. O uso do FOLFOXIRI comparativamente ao FOLFIRI ainda permanece controverso. As FP são agentes anti-metabolitos que, predominantemente, inibem a timidilato sintase o que leva à acumulação de erros no DNA. A oxaliplatina é um composto de diaminociclohexano de platina que impede a replicação do DNA e induz a apoptose celular. Já o irinotecano é um derivado do alcaloide natural camptotecina que inibe a ação da topoisomerase I (Akhtar *et al.* 2014; Cutsem *et al.* 2018; Stintzing 2014; Veenstra e Krauss, 2018).

Tendo em conta o CCR em estágio III, a cirurgia é o principal tratamento em 70 a 80% dos casos, no entanto, 5 anos após cirurgia, a recidiva é observada em quase 30% dos doentes. A quimioterapia adjuvante pode ser crucial na prevenção da recidiva e no melhoramento da sobrevida geral. A base da quimioterapia é o 5-FU e incluindo a combinação FOLFOX, no entanto têm vindo a ser desenvolvidos novos fármacos no tratamento do CCR que incluem a capecitabina e tegafur com uracilo (Upadhyay *et al.* 2015). Nos estádios mais avançados de CCR, estágio IV, a quimioterapia é aplicada no sentido paliativo, na tentativa de prolongar a sobrevida geral dos doentes. Tal como no estágio III, no estágio IV, a base da quimioterapia é o 5-FU, incluindo a combinação FOLFOX ou o FOLFIRI. Nestes casos a cirurgia, quando aplicada, é meramente paliativa, na tentativa de aliviar os sintomas, nos casos dos doentes sintomáticos (Munker *et al.* 2018).

1.8.1 Modificadores epigenéticos

A metilação do DNA é uma modificação genética, por metiltransferases de DNA (DNMT), que nas células normais permite controlar processos de transcrição genética. Nas células cancerígenas a metilação do DNA é muitas vezes perdida ou anormalmente aumentada, em especial a hipermetilação das ilhas CpG de genes supressor de tumor. Agentes desmetilantes como a azacitidina (Aza) têm vindo a demonstrar uma capacidade inibidora das DNMT de uma maneira dependente da dose e do tempo. Isto acontece pois a Aza é um análogo da citosina que consegue, após uma modificação, ser incorporada no DNA e ligar-se de forma covalente as DNMT impedindo o seu normal funcionamento. Existem muitos estudos que descrevem a hipermetilação como associada

ao prognóstico de diferentes cânceros incluindo o CCR. A Aza foi aprovada para o tratamento da leucemia mieloide e mais recentemente têm sido iniciados ensaios clínicos com o objetivo deste fármaco ser utilizado no tratamento de tumores sólidos (Gotze, K *et al.*, 2009; Talwar, 2010).

A modificação covalente das histonas engloba um das principais características epigenéticas da cromatina, que, alterando a organização nucleossômica, leva à ativação ou repressão de genes. O vorinostato, um inibidor de histona desacetilases (HDAC), demonstrou ser um fármaco promissor no tratamento de vários cânceros. Estudos demonstraram que a administração parenteral e oral do vorinostato, em doses que produzem pouca ou nenhuma toxicidade para células normais, levavam à paragem do crescimento de células tumorais de cancro do cólon (Parbin *et al.*, 2013; Richon, 2006).

1.8.2 Inibidores da via de sinalização *Hedgehog*

O *human glioma-associated oncogene homolog 1* (GLI1) e 2 (GLI2) são reguladores transcricionais que fazem parte da via de sinalização *Hedgehog* (SHH). Tanto o *GLI1* como o *GLI2* são oncogenes, os quais, são ativados de forma aberrante, o que leva à sua expressão constitutiva nos tumores.

Até o momento, o papel da via de sinalização SHH, no desenvolvimento e progressão do CCR ainda permanece controversa, no entanto, a maioria dos autores concorda que, uma elevada ativação desta via está associada ao desenvolvimento de CCR. Defendem ainda que a sinalização SHH é ativada tanto pela sinalização canônica (via Smo) como pela ativação não canônica (via RAS / RAF) (Wu *et al.*, 2017).

O GANT61 é um inibidor do GLI, estudos recentes têm vindo a demonstrar a capacidade deste inibidor em provocar citotoxicidade em células de CCR. A inibição desta via pode ser útil no tratamento de diferentes tipos de CCR e, portanto é necessária uma pesquisa mais extensa sobre o efeito do tratamento dos inibidores da SHH no CCR. (Mazumdar *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017)

1.8.3 Nutracêuticos

Existem inúmeros estudos no sentido de se descobrir novos fármacos, baseados em alvos moleculares. Há, cada vez mais, uma procura no sentido de perceber a capacidade quimioterápica de substâncias naturais (nutracêuticos), uma vez que possuem menor toxicidade comparativamente aos fármacos convencionais, e que podem superar a resistência terapêutica.

Compostos derivados de plantas, como os isotiocianatos (ITC) e as flavonas polimetoxiladas (FP) parecem apresentar propriedades quimioterápicas promissoras. Os compostos ITC apresentam propriedades quimiopreventivas e quimioterápicas e por isso são um bom candidato no tratamento do cancro. O sulforafano (SF) é um ITC derivado de vegetais crucíferos, sendo que alguns estudos apontam para a sua capacidade anti-proliferativa. Estudos também revelam que o extrato de casca de laranja (OPE), enriquecido em FP, apresentou capacidades anticancerígenas (Dong *et al.*, 2014; Erzinger *et al.*, 2016; Pocasap e Weerapreeyakul, 2016; Silva *et al.*, 2018).

1.9 Estudos Prévios

Como referido anteriormente, o gene *TCF7L2* apresenta um papel importante na biologia do CCR, no entanto o seu papel enquanto supressor tumoral ou oncogene é ainda controverso. Têm sido descritas diferentes isoformas resultantes de *splicing* alternativo que são diferencialmente expressas dependendo do tipo de tecido, as quais podem ter efeitos fisiológicos e fisiopatológicos diferentes (Le Bacquer *et al.*, 2011). Para além da frequência de mutações somáticas neste gene, que tem sido reportada em CCR, tem sido equacionado o papel de polimorfismos específicos neste gene no risco de CCR. Entre estes encontram-se o rs12255372 e o rs7903146, os quais têm sido associados ao risco aumentado de desenvolver diabetes do tipo II (Ngoi *et al.*, 2008), sendo que o ultimo tem sido também associado ao risco de desenvolvimento de vários cancros, entre os quais CCR (Ngoi *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2013).

Em estudos prévios, realizados pelo grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG), num grupo de cerca de 100 de indivíduos que preenchiam pelo menos um dos CB, que incluíram amostras de tumor e mucosa normal incluída em parafina, foi observada uma diferença entre a frequência dos genótipos dos polimorfismos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 do gene *TCF7L2* comparativamente com o esperado tendo em conta o reportado para a população ibérica e europeia. Deste modo, colocou-se a hipótese, de alterações envolvendo estes 3 polimorfismos poderem interferir com a regulação e expressão do *TCF7L2*, por se encontrarem na região promotora do gene, e deste modo influenciar o risco de desenvolvimento de CCR. Este facto também era suportado pela identificação de alterações na região *upstream* do gene e exões proximais, que se associaram significativamente à metastização à distância (Duarte, 2015). Posteriormente, colocou-se também a hipótese dos genótipos para outros polimorfismos do gene *TCF7L2* (nomeadamente no intrão 4 e 5, como o rs7903146 e o rs12255372) poderem influenciar a expressão de isoformas do gene *TCF7L2*. Tendo em conta estes resultados, torna-se importante analisar o genótipo para os polimorfismos num maior número de casos, assim como avaliar o papel dos polimorfismos na expressão de isoformas do gene *TCF7L2*.

Por outro lado, foi descrito que isoformas do gene *TCF7L2* que não expressam o exão 4 estão associadas ao aumento da agressividade tumoral no carcinoma hepatocelular (Tomimaru *et al.*, 2014). Desta forma, seria interessante prosseguir com este estudo na tentativa de perceber se isoformas do gene *TCF7L2* que não expressam o exão 4, poderão estar relacionadas com uma maior capacidade de EMT e neste sentido, a uma maior capacidade de metastização.

Noutro estudo também realizado pelo grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG), para a expressão de isoformas do gene *TCF7L2*, observou-se na linha celular HT29, a presença de fragmentos adicionais resultantes da amplificação entre os exões 1-5, que relevaram corresponder a repetições de exões (exões 4, 5). Noutro estudo, realizado também pelo grupo, para a linha HT29 em cultura 3D (esferóide) verificou-se que, apenas para os genes associados à *stemness*, *PROM1* e *CD44*, com o aumento do tempo em cultura observava-se a presença de fragmentos adicionais que pareciam, também, corresponder a repetição de exões. A partir destes resultados postularam-se duas hipóteses, estas repetições de exões ou se tratavam de duplicações, ou de circRNA. De modo a

verificar se estas repetições poderiam corresponder a circRNA o grupo de Gastrenterologia (UIPM-IPOLFG), utilizou a enzima RNase R, uma vez que apenas o circRNA é resistente a esta enzima. O grupo comprovou, que após o tratamento do RNA, era ainda possível sintetizar cDNA e amplificar o mesmo, desta forma os resultados sugeriram que o RNA estaria sob a forma circular, uma vez que a RNaseR não tinha sido capaz de o degradar. Tendo em conta estes resultados, torna-se importante confirmar se realmente estas isoformas correspondem a circRNA, e, caso se confirme, qual o papel destas, tanto no desenvolvimento como na agressividade tumoral ou aumento do risco para CCR.

Tendo em conta os vários tipos de CCR existem várias linhas celulares que são representativas dos mesmos (tabela 1.3). Deste modo, o grupo Gastrenterologia (UIPM-IPOLFG), tem vindo a analisar a resposta de várias linhas celulares de CCR a determinados fármacos, em termos da viabilidade e migração celular, como também na expressão de vários genes associados ao CCR. Estas alterações têm-se verificado promissoras no sentido de orientar os tratamentos dos doentes consoante os diferentes estádios do cancro.

Neste sentido, é importante prosseguir com os estudos nas linhas celulares de CCR, por forma a se tentar, cada vez mais, direccionar a terapia para cada tipo de cancro, assim como perceber a heterogeneidade dos vários tipos de CCR.

Assim, devido à necessidade de adoção de estratégias terapêuticas mais personalizadas, i.e. mais orientadas para o subtipo de tumor, neste âmbito, este trabalho focou-se em dois subtipos de CCR: 1) tumores MSI com elevado potencial metastático, infiltração de células do sistema imunitário, mau prognóstico após recidiva, subtipo molecular CMS1, representados pela linha celular LoVo, 2) tumores MSS, com elevada sinalização TGF- β , elevada infiltração fibroblastos no microambiente tumoral, mau prognóstico, subtipo molecular CMS4, representados pela linha celular SW480. Os subtipos de CCR representados pela linha celular LoVo, apresentam MSI, mutação nos genes *APC* e *KRAS*, fenótipo CIMP-, assinatura molecular típica de EMT. Os subtipos de CCR representados pela linha celular SW480 são CIN, MSS, com mutação nos genes *APC*, *KRAS* e *TP53*, amplificação do oncogene *MYC*, fenótipo CIMP-, ativação da sinalização Wnt e PI3K/AKT e inibição da via EGFR (Berg *et al.*, 2017).

Tabela 1.3 – Características associadas a linhas celulares de CCR.

Linha celular	Características	Estado MSI
HCT116	Estádio IV	MSI
LoVo	Derivada de metástases supraventriculares de CCR	MSI
SW48	Estádio III	MSI
LS174T	Estádio II / histologia mucinosa	MSI
HT29	Estádio III / histogogia mucinosa	MSI, CIN, mutações <i>BRAF</i>
SW480	Estádio II	MSS, CIN

MSI – Instabilidade de microssatélites; MSS – Estabilidade de microssatélites; CIN – instabilidade cromossómica (Berg *et al.*, 2017).

1.10 Objetivo

O presente estudo, teve como objetivo principal, a identificação de potenciais biomarcadores de diagnóstico e de progressão e o estudo de novas terapias na tumorigénese colorectal e na metastização,

Para tal, pretendeu-se avaliar o papel de diferentes genótipos para os polimorfismos localizados na região upstream do exão 1 e nos intrões 4 e 5 do gene *TCF7L2*, assim como da expressão de isoformas deste gene, que codifica para um importante fator de transcrição da via Wnt, não só como potenciais biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico, como também a sua associação ao risco aumentado de CCR. Pretendeu-se também, avaliar a existência de RNAs circulares não só para o gene *TCF7L2*, como também, para os genes associados à *stemness* *CD44* e *PROM1*, no cancro colorectal, e o seu eventual papel como potenciais biomarcadores de diagnóstico/prognóstico.

Pretendeu-se ainda, identificar compostos/fármacos com efeito anti-proliferativo e anti-migratório/metastático promissor em dois subtipos de CCR distintos que se caracterizam por resistência à terapêutica e comportamento agressivo, representados pelas linhas celulares LoVo e SW480: a primeira representativa de tumores MSI com elevado potencial metastático e mau prognóstico após recidiva, e a segunda representativa de tumores MSS, com elevada sinalização TGF- β e infiltração de fibroblastos no microambiente tumoral e mau prognóstico no global. Deste modo, pretendeu-se contribuir para a definição de terapêuticas cada vez mais adequadas para tipos específicos de CCR, caminhando assim no sentido da cada vez mais actual medicina de precisão.

2 Métodos

2.1 Material Biológico

Para a análise do genótipo dos polimorfismos rs3814570, rs10885394 e rs10885395, localizados na região upstream do gene *TCF7L2*, foram incluídas neste estudo, 29 amostras de DNA extraído a partir de tecido tumoral incluído em parafina, 5 amostras de DNA, extraídas a partir de sangue periférico e 15 amostras de DNA extraído a partir de mucosa normal incluída em parafina de indivíduos com CCR que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda, de modo a ampliar uma série prévia de DNA de tumor e mucosa normal e perfazer um total de 262 amostras de DNA tumoral e normal emparelhadas, num total de 131 indivíduos. Foram ainda incluídas para a análise destes polimorfismos, 3 amostras de DNA extraído a partir de tecido tumoral incluído em parafina e 2 amostras de DNA extraído a partir de mucosa normal incluída em parafina de doentes com CCR esporádico que contribuíram para completar o estudo num total 8 indivíduos com CCR esporádico. Como controlos da população portuguesa para a frequência dos polimorfismos, foram analisadas 50 amostras de DNA extraído a partir de sangue periférico de 50 indivíduos saudáveis.

Adicionalmente, os polimorfismos foram também analisados em amostras de DNA das linhas celulares de CCR LoVo, HT-29, SW48, SW480, LS174T e HCT116.

De modo a avaliar uma potencial relação entre o genótipo para os polimorfismos, não apenas na região upstream do gene mas também nos intrões 4 e 5, e a expressão de isoformas específicas, nomeadamente que expressam ou não o exão 4, foram incluídas 10 amostras de RNA e DNA, extraídas a partir de sangue periférico, de indivíduos índice de famílias FCCTX ou FCCTX-like (critérios de Bethesda 4 e 5), para as quais foi efectuado RT-qPCR para as junções exões 1-2, 3-4 e 3-5, assim como análise dos polimorfismos, respectivamente. Na análise de expressão por RT-qPCR, do gene *TCF7L2*, utilizando *primers* para as junções 1-2, 3-4 e 3-5, foram ainda incluídas, neste estudo, 8 amostras de RNA extraídas a partir de tecido tumoral incluído em parafina e 8 amostras de RNA extraído a partir de mucosa normal incluída em parafina de 16 doentes que apresentavam CCR em estágio III, destas 4 pertenciam a doentes com recidiva tumoral e as restantes 4 a indivíduos sem recidiva, ou seja, livres de doença. Estes constituíram um estudo piloto para averiguar a existência de relação entre estas isoformas, nomeadamente envolvendo o *splicing* do exão 4, e a metastização.

A análise de formas circRNA dos genes *TCF7L2*, *PROM1* e *CD44* foi efectuada para amostras de RNA das linhas celulares de CCR LoVo, HT-29, SW48, SW480, SW620, LS174T e HCT116. Foram ainda incluídas nesta análise de circRNA uma amostra de RNA de uma linha celular de cólon normal e de uma linha de fibroblastos, assim como amostras de RNA de sangue periférico de 11 doentes com CCR (FCCTX).

Os ensaios anti-proliferativos e de migração celular, assim como de expressão de marcadores relevantes para o ciclo celular, EMT, *stemness*, e vias de sinalização específicas, após tratamento com os vários compostos, foram realizados. nas linhas celulares de CCR LoVo e SW480, cuja caracterização se encontra descrita na secção introdução, ponto 1.9 estudos prévios.

Todos os doentes incluídos neste estudo são ou foram seguidos na consulta de risco de CCR do Instituto de Oncologia Francisco Gentil de Lisboa, EPE. .

As linhas celulares foram providenciadas pelo professor Riccardo Fodde (*Department of Pathology, Erasmus MC Cancer Institute, Erasmus University Medical Center, Rotterdam*).

2.2 Extração de ácidos nucleicos

As extrações de DNA genómico e RNA a partir de sangue periférico e tecido incluído em parafina das amostras usadas neste estudo, já tinham sido efetuadas previamente.

2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA a partir de sangue periférico foi realizada a partir do *kit Gentra Puregene Blood (Qiagen)*, de acordo com as instruções do fabricante. A extração de DNA genómico a partir de linhas celulares de CCR foi realizada também com o *kit Gentra Puregene Blood (Qiagen)* a partir de um *pellet* de células, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA extraído, em ambos os casos, foi realizada no espectrofotómetro *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™)*. A extração de DNA a partir de tecido incluído em parafina foi realizado segundo o método fenol-clorofórmio. Como os reagentes utilizados nesta extração absorvem a um comprimento de onda igual aos ácidos nucleicos (260nm), a quantificação foi efetuada por comparação com amostras de DNA com concentração conhecida. Para tal as amostras foram preparadas usando 1µL de DNA e 9µL de Orange 1x (tampão de deposição corado utilizado para conferir densidade à amostra e permitir a sua visualização durante a eletroforese) e submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v), em TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) (*National Diagnostics*) numa tina horizontal a uma voltagem constante de 140V durante aproximadamente 30 minutos. Foram também depositados no gel 6,5µL de *GeneRuler 50pb DNA ladder (ThermoFisher Scientific)*, marcador de peso molecular de referência que conta com uma gama de bandas entre 50 e 1000 pb, e de *lambda/HindIII (Fermentas)*, marcador de peso molecular com uma gama de pesos entre 125 23130pb. Após a eletroforese, o gel de agarose, que se encontra corado com brometo de etídeo (100mg/ml, *MP biomedical*), foi visualizado utilizando o transiluminador *BioDocAnalyze (Biometra)*. Todas as soluções utilizadas na preparação da eletroforese encontram-se descritas no anexo I. Uma vez conhecida a concentração das amostras estas foram diluídas em água bidestilada (ddH₂O) de maneira a se obter uma concentração final de trabalho de 80ng/µL e posteriormente armazenadas a -20°C.

2.2.2 Extração de RNA

A extração de RNA a partir de sangue periférico foi realizada usando a solução *TRI Reagent® (Ambion, Life Technologies)*, de acordo com as instruções do fabricante. A extração de RNA a partir de linhas celulares de CCR foi realizado usando o *RNeasy mini kit (QIAGEN, USA)*, a partir de um *pellet* de células de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas na *Nanodrop (Thermo Scientific™)* como descrito anteriormente. Em adição, de modo a avaliar a integridade e pureza do RNA obtido, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a

0.8% (p/v), como descrito no ponto anterior. Após a extração as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

2.3 Polymerase Chain Reaction

A *polymerase chain reaction* (PCR) é uma técnica laboratorial revolucionária desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80 que se baseia na capacidade de síntese de novas cadeias de DNA pela DNA polimerase. Existem várias polimerases que podem ser usadas na reação mas a mais comumente utilizada tem origem na bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq*). Esta técnica é usada para amplificar uma sequência específica de DNA originando milhares de cópias da original, sendo necessária a presença de 4 componentes essenciais: DNA molde, desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTP's), oligonucleótidos iniciadores de cadeia (*primers*), Mg^{2+} e a DNA polimerase. O PCR é um processo que inclui três passos: o primeiro consiste na desnaturação da dupla cadeia do DNA molde; o segundo passo consiste na hibridação dos *primers* às cadeias dissociadas opostas, de modo a limitar a região que se quer amplificar, sendo que a temperatura ótima para a ligação varia consoante a sua sequência; o último passo do processo é a extensão da cadeia, que ocorre normalmente a 72°C, a qual é catalisada pela enzima sendo necessária a presença de Mg^{2+} e dNTP's. Este processo é repetido num número de ciclos que varia normalmente, entre 30 a 40.

2.3.1 Otimização das condições de reação de PCR

Para cada reação de PCR é necessário realizar uma otimização de maneira a tornar a reação específica e eficiente para o fragmento que se quer amplificar. Deste modo para cada fragmento a concentração de Mg^{2+} , a temperatura de hibridação dos *primers*, o número de ciclos e o *kit* da DNA polimerase utilizado foram otimizados. A temperatura teórica de hibridação dos *primers* é calculada individualmente para cada *primer* (*reverse* e *forward*) e é obtida pela equação 1:

(Equação 1)

$$\text{Temperatura de hibridação primer (Thibridação (°C))} = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Onde as letras A, T, G e C correspondem respetivamente às bases azotadas: adenina, timina, guanina e citosina. Após o cálculo da temperatura de hibridação teórica para cada *primer* a temperatura inicial usada na reação é calculada de acordo com a equação 2:

$$\text{Temperatura de hibridação(°C)} = \frac{\text{Thibridação reverse} + \text{Thibridação forward}}{2} - 2 \quad (\text{Equação 2})$$

Posteriormente é necessário confirmar se é necessário algum ajuste aumentando ou diminuindo a temperatura calculada. Normalmente, no caso de se verificar a presença de produtos inespecíficos, assim como a presença de dímeros de *primers*, aumenta-se a temperatura. Quando, após a reação de PCR, não se verifica a presença de produto amplificado normalmente diminui-se a temperatura. Como já referido, outro parâmetro que pode ser ajustado é a concentração de Mg^{2+} utilizada na reação, para tal procede-se a uma titulação de Mg^{2+} . Normalmente para concentrações de Mg^{2+} elevadas verifica-se um aumento de produtos inespecíficos. Na generalidade das reações de PCR foram efetuadas utilizado o *kit Biotaq™* (Bioline). No entanto, quando as alterações dos

parâmetros, mencionados anteriormente, não foram eficazes otimizou-se a reação utilizando o *kit AmpliTaq Gold®* (Applied Biosystems), cuja enzima necessita de um aumento inicial da temperatura (*hotstart*) para que fique ativa, o que resulta num aumento da especificidade da reação de PCR.

2.3.2 Amplificação de cDNA/DNA genômico por PCR

As amostras de DNA e cDNA utilizadas neste estudo foram amplificadas num volume reacional de 12,5µL. Quer para as amostras amplificadas utilizando o *kit AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems) como para as amplificadas com o *kit Biotaq™* (Bioline) a mistura reacional consistiu em: 1µL de DNA (80ng/µL) ou cDNA, 0,3µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (10pmol/µL), 1 µL de dNTPs (200 mM, *Illustra™*, GE Healthcare), 1,25µL da solução de tampão reacional, 0,08µL da DNA polimerase (5U/µL), a quantidade de solução de MgCl₂ otimizada e ddH₂O de modo a perfazer o volume final. A solução tampão, a DNA polimerase e a solução de MgCl₂ foram providenciadas pelo *kit* utilizado. Todas as reações de amplificação decorreram num termociclador UNO96 (VWR), sendo que as condições de amplificação por PCR se encontram descritas no anexo II.

2.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Após a realização da reação de PCR é necessário proceder a uma avaliação da eficiência da reação por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v). A eletroforese em gel de agarose é uma técnica que se baseia na separação dos fragmentos de DNA amplificados através da aplicação de uma diferença de potencial, os quais migram no gel de acordo com o seu peso molecular. A visualização dos fragmentos amplificados no gel é conseguida através da utilização de um composto intercalante de ácidos nucleicos, como o brometo de etídio, o qual emite fluorescência aquando incidência de radiação ultravioleta.

No caso da reação de PCR ser uma otimização, aos 12,5µL de produto amplificado foram adicionados 3µL de *Orange G 5x*, enquanto que para os produtos de PCR das amostras de interesse, foi retirado uma alíquota 3µL de produto amplificado ao qual se adicionou 7µL de *Orange 1x*. O total do volume, em ambos os casos, foi depositado no gel, assim como 6,5µL de *GeneRuler50bpDNALadder* (ThermoFisher Scientific), tendo a eletroforese decorrido em tampão TBE 1x, numa tina horizontal a uma voltagem de 140V durante aproximadamente 30 minutos. Após a eletroforese o gel de agarose foi visualizado utilizando o transiluminador *BioDocAnalyze* (Biometra). Todas soluções utilizadas na preparação da eletroforese encontram-se descritas no anexo I.

2.4 Sequenciação de Sanger

O método de sequenciação de Sanger foi desenvolvido nos anos 70 por Frederick Sanger e baseia-se na utilização de dNTP's juntamente com pequenas concentrações de didesoxirribonucleótidos fosfatados (ddNTP's). Os ddNTP's levam a que a reação de polimerização acabe precocemente devido à falta do grupo hidroxilo na posição 3' que impede a formação de ligações fosfodiéster com novos dNTP's e deste modo obtêm-se diferentes moléculas de DNA que diferem entre si por apenas um nucleótido. Cada ddNTP é marcado com um fluoróforo diferente o que

permite a sua identificação, uma vez que após a reação de sequenciação, os fragmentos obtidos são separados de acordo com o peso molecular numa eletroforese capilar que ocorre num sequenciador automático, onde um feixe laser provoca a emissão de fluorescência num comprimento de onda diferente dependendo do fluoróforo em que incide.

2.4.1 Purificação dos produtos amplificados por PCR

Antes de se dar início à reação de sequenciação é necessário proceder a uma purificação do produto amplificado por PCR, de modo a eliminar dNTP's e *primers* que não foram consumidos na reação. Para tal, efetuou-se uma purificação enzimática quando o produto obtido correspondia a um único fragmento específico, adicionando-se diretamente ao produto de PCR 0.5µL de *Exonuclease I* (Exo I) (20 U/µL *Thermo Scientific*) e 1µL *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (FastAP) (1 U/µL *Thermo Scientific*). A reação foi realizada num termociclador a 37°C durante 15 minutos, seguido de um período de inativação da enzima durante 15 minutos a 85°C. Caso o produto obtido na reação de PCR não corresponda a um único fragmento, por exemplo, no caso da existência de diferentes isoformas, ou quando a reação não foi suficientemente eficiente para se obter um único fragmento específico recorre-se a outro método de purificação. Neste caso a banda de interesse foi excisada diretamente do gel de agarose com recurso a um bisturi e colocada numa coluna de purificação do *kit Cut&Spin Gel Extraction Columns* (GRiSP), sendo de seguida centrifugada a 6000g durante 10 minutos.

2.4.2 Reação de sequenciação

Para cada amostra amplificada foram realizadas duas reações de sequenciação uma com o *primer reverse* e outra com o *primer forward*. Cada reação de sequenciação foi preparada para um volume final de 20µL contendo: 2µL de *primer* (*reverse* ou *forward*) (1,6 pmol/µl); 2µL de tampão de sequenciação 5x, *BigDye™ Terminator v1.1* (*Applied Biosystems*); uma quantidade variável de produto amplificado que depende do tamanho do fragmento e da intensidade da banda obtida no gel de agarose 2% (p/v) como descrito no ponto 2.3.2; uma quantidade variável da mistura reacional de sequenciação, *BigDye™ Terminator v1.1* (*Applied Biosystems*), que depende do tamanho do fragmento a sequenciar; ddH₂O de modo a perfazer o volume final. A reação de sequenciação foi realizada num termociclador de acordo com o programa descrito no anexo II. Após a reação os produtos obtidos foram armazenados a 4°C durante um máximo de 24h até se ter procedido a precipitação do DNA.

2.4.3 Precipitação e purificação do DNA após reação de sequenciação

Após a reação de sequenciação, a purificação e precipitação do DNA foi realizado de acordo com as recomendações do *kit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*), que se baseia numa reação de *salting-out* e tem como objetivo eliminar qualquer componente que possa interferir na eletroforese capilar. O produto total obtido na reação de sequenciação é adicionado a uma mistura reacional constituída por: etanol absoluto, que promove a precipitação do DNA; EDTA

(ácido etilenodiamino tetra-acético), um composto quelante de íons bivalente, que ao quelatar o Mg^{2+} vai inativar a enzima usada na reação de sequenciação e acetato de sódio, que neutraliza a carga do DNA. As amostras foram depois centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* obtido foi adicionado etanol 70% (v/v) e as amostras foram centrifugadas com o objetivo de remover o excesso de sal do DNA. De seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a 37°C e mantido a 4°C até ser efetuada a eletroforese capilar. O protocolo detalhado encontra-se descrito no anexo III.

2.4.4 Preparação das amostras para eletroforese capilar no sequenciador automático

Os *pellets* secos, obtidos após purificação e precipitação dos DNAs, foram ressuspensos em 17µL de formamida *HI-DI* (*Applied Biosystems*), agente desnaturante usado como solvente para a injeção capilar. As amostras foram depois transferidas para uma placa de 96 poços (*Platamax*, *Axygen*), a qual foi selada e colocada num termociclador durante 10 minutos a 95°C para desnaturação das amostras. De seguida a placa foi colocada em gelo de modo a prevenir a renaturação das amostras e centrifugada durante 2 minutos a 1200 rpm de modo a eliminar qualquer bolha que pudesse interferir na eletroforese capilar. O selo foi retirado e a placa foi colocada no sequenciador automático *ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) onde decorreu a eletroforese capilar a uma temperatura de 50°C e a uma voltagem de 15 KV.

2.4.5 Análise de resultados

Por cada amostra obteve-se um eletroforetograma através do *software Sequencing Analysis 3.4.1* (*Applied Biosystems*), a sequência obtida foi comparada e analisada manualmente com uma sequência de DNA de referência, para o gene em estudo adquirida na base de dados *Ensembl* (GRCh38.p12), disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html> (Acedido em: 09/06/2018).

2.5 Reação de transcrição reversa para síntese de cDNA

A reação de transcriptase reversa (RT) consiste na conversão de uma molécula de RNA molde, em cadeia simples, em DNA completo (cDNA). Nesta reação são utilizados *primers* aleatórios que se ligam às moléculas de RNA mensageiro (mRNA) e com a enzima transcriptase reversa, DNA polimerase dependente de RNA, que catalisa a mesma. A quantidade de RNA utilizada na síntese de cDNA foi sempre que possível, de 1000 ng em 7,25µL de volume final. Para a realização da reação foi necessário preparar duas misturas reacionais diferentes. A primeira mistura continha: 0,5µL de hexâmeros (3 µg/µL, *Roche*) funcionam como *primers* aleatórios; volume variável de RNA de cada amostra de modo a obter a quantidade acima referida; ddH₂O tratada com pirocarbonato dietil (DEPC) (*MERK*), que inativa as enzimas RNases que possam estar presentes na água, de modo a perfazer o volume final de 7,75µL. Esta mistura reacional foi colocada num termociclador para que se realizasse a fase de hibridação dos *primers* com as moléculas de RNA, durante 10 minutos a uma temperatura de 70°C. Depois as amostras foram postas em gelo de modo a que fosse adicionada uma segunda mistura reacional constituída por: 4µL de tampão 5x *First Strand* (*Invitrogen*), que

mantem o pH ótimo constante para a realização da reação; 4µL de dNTPs (200 mM, *Illustra™ GE Healthcare*); 2µL de Ditioneitol (DTT) (*Invitrogen*), que funciona como um estabilizador da enzima transcriptase reversa; 1µL de Transcriptase Reversa *Superscript® II* (*Invitrogen*); 0,75µL de inibidor recombinante de ribonuclease, *RnaseOut™* (*Invitrogen*), que inativa as enzimas RNAses que possam estar presentes; 0,5µL de ddH₂O tratada com DEPC (*MERK*) por forma a perfazer o volume final de 12,25µL. Os tubos foram recolocados no termociclador de modo a que a reação prosseguisse ocorrendo inicialmente a síntese de cDNA a 42°C e por último a elongação a 70°C. Após a síntese de cDNA as amostras foram armazenadas a -20°C. O programa detalhado encontra-se descrito no anexo II.

2.6 PCR quantitativo

O PCR quantitativo (qPCR) é uma técnica que se baseia no PCR convencional mas que permite a quantificação de produto inicial presente na amostra com grande precisão e sensibilidade. Isto é possível uma vez que o qPCR permite detetar a acumulação de produto enquanto a reação progride recorrendo ao uso de uma molécula fluorescente, sondas ou agentes intercalantes, que emite fluorescência proporcionalmente à quantidade de produto amplificado. Tal como o PCR convencional o qPCR tem duas fases: uma fase exponencial, onde a quantidade de produto amplificado duplica a cada ciclo e uma fase estacionária onde um ou mais reagentes se tornam limitantes para a reação. Para cada reação de qPCR é determinado o ciclo *threshold* (Ct), que corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência consiga ser detetada, uma vez que no início da reação a fluorescência emitida não é suficiente para ser detetada pelo *software* do equipamento utilizado (figura 2.1). Estes valores de Ct permitem calcular a quantidade de amostra inicial presente na reação, sendo que quanto maior este valor, menos ciclos de amplificação serão necessários para produzir o sinal fluorescente detetável, levando a um valor de Ct mais baixo. O qPCR permite dois tipos de quantificação: absoluta e relativa. Através da quantificação absoluta é possível quantificar amostras cuja concentração é desconhecida por interpolação de uma curva *standard*. A quantificação relativa é obtida através da normalização do gene alvo pelo gene referência, de acordo com a equação 3. Os valores obtidos para as amostras em estudo vão ser normalizados de acordo com uma amostra referência, de acordo com a equação 4. Normalmente são usados como referência genes *housekeeping*, uma vez que são expressos de igual forma em todas as células. Por fim, para se calcular o rácio da expressão recorre-se à equação 5.

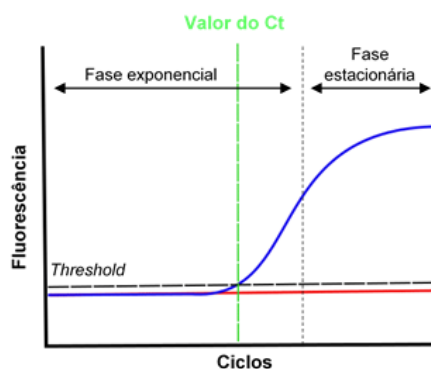


Figura 2.1 – Representação gráfica das fases do qPCR

(adaptado de: adaptado de: <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>. Acedido em: 09/06/2018)

Normalização do Ct do gene alvo pelo gene de referência:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ referência}) \quad (\text{Equação 3})$$

Normalização do ΔCt da amostra ao ΔCt da amostra referência:

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{amostra referência}) \quad (\text{Equação 4})$$

Cálculo do rácio da expressão:

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = \text{Rácio da expressão normalizada.} \quad (\text{Equação 5})$$

2.6.1 Otimização das condições da reação de qPCR

Antes da realização de qualquer ensaio qPCR é necessário determinar a eficiência da reação do gene alvo e dos genes de referência. A eficiência é calculada a partir dos valores de Ct obtidos para a concentração escolhida da amostra e para o gene em estudo. Para calcular a eficiência de amplificação para cada gene alvo ou referência foi necessário realizar uma diluição seriada de um cDNA de referência (40, 20, 10, 5 e 2,5 ng/ μ L). As reações de qPCR foram realizadas, em duplicado, numa placa de 96 poços (*ABI PrismTM Optical 96-Well Reaction Plate*) para um volume final de 15 μ L que compreende: 0,75 μ L de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 7,5 μ L de *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*); 4 μ L de ddH₂O; 2 μ L de cDNA diluído em ddH₂O (40, 20, 10, 5 e 2,5 ng/ μ L), exceto no caso do controlo negativo onde o cDNA foi substituído por ddH₂O. As reações foram realizadas no *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*) e analisadas a partir do *software SDS 2.4 software* (*Applied Biosystems*). Posteriormente uma curva padrão foi desenhada traçando o logaritmo da concentração inicial de amostra contra o valor médio do Ct obtido durante a amplificação de cada diluição. A partir da curva padrão obtida é possível calcular a eficiência (E) da reação, como demonstrado pela equação 6:

Eficiência (E) da reação:

$$\text{Eficiência (E)} = 10^{-\frac{1}{m}} \quad (\text{Equação 6})$$

2.7 Análise de formas de circRNA dos genes *CD44*, *PROM1* e *TCF7L2*

De modo a amplificar cDNA proveniente de RNA circular, o grupo de Gastroenterologia da UIPM, desenhou *primers* específicos, com direções contrárias às usadas na amplificação de cDNA linear. Como se pode ver pela figura 2.2, estes *primers* contrários não conseguem amplificar cDNA a menos que este se encontre sob forma circular.

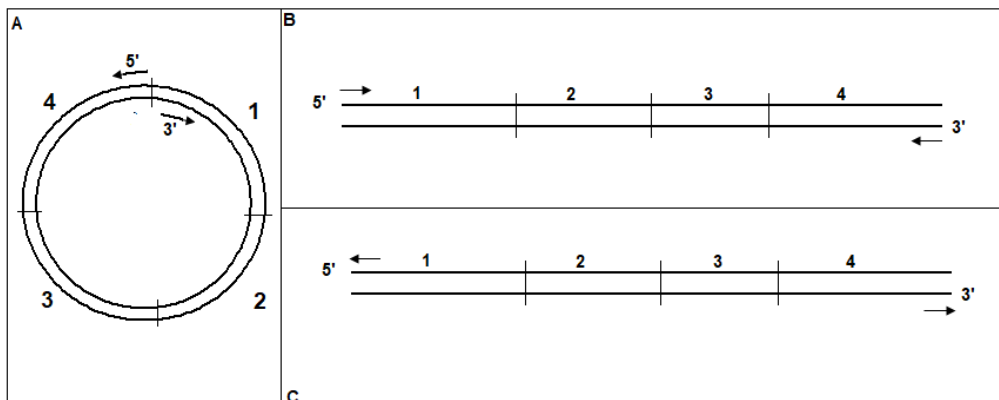


Figura 2.2 – Esquema representativo da direção dos primers utilizados na amplificação por PCR de cDNA circular e cDNA linear. A – Direção dos primers utilizados para amplificar apenas cDNA circular. B – Representação esquemática da direção dos primers numa reação de PCR para cDNA linear. C – Representação esquemática da direção dos primers utilizados para amplificar apenas cDNA circular em cDNA linear.

Com o objetivo comprovar a existência de formas de circRNA do gene *TCF7L2*, realizou-se a amplificação dos exões 4 e 5, utilizando *primers* contrários representados na figura 2.3 A. Também com o mesmo objetivo, mas para o gene *CD44*, realizou-se a amplificação dos exões 1 e 2, (figura 2.3 B) e para o gene *PROM1*, realizou-se a amplificação dos exões 4 e 5, utilizando *primers* contrários (figura 2.3 C). Os *primers* utilizados na amplificação de formas de circRNA encontram-se descritos no anexo IV.

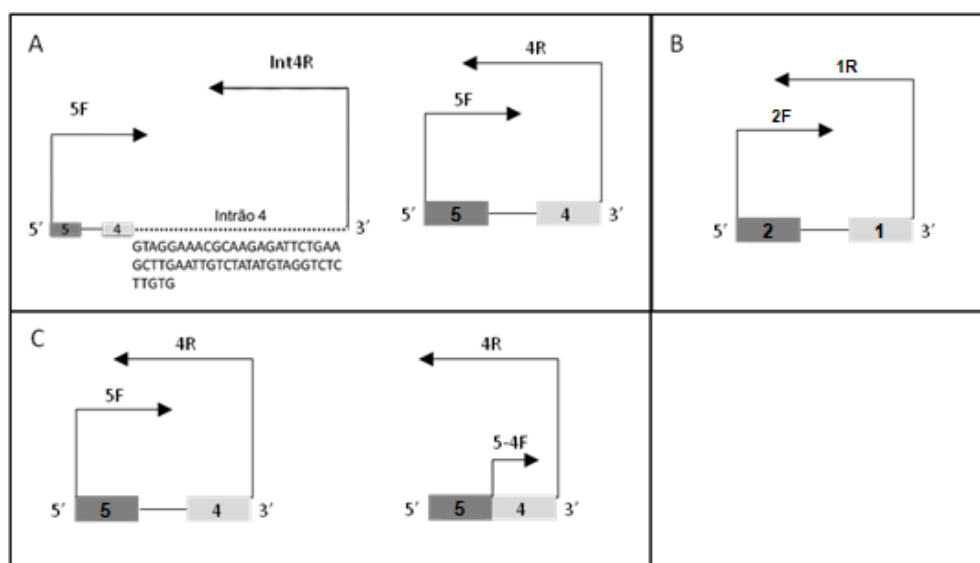


Figura 2.3 - Esquema representativo da posição dos primers utilizados para amplificação de circRNA dos genes (A) – *TCF7L2*, (B) – *CD44* e (C) – *PROM1*.

2.8 Análise de polimorfismos do gene *TCF7L2*

Foram analisados sete polimorfismos do gene *TCF7L2*, dos quais três localizam-se na região 5' UTR (rs3814570, rs10885394 e rs10885395), dois no intrão 4 (rs7901695 e rs7903146) e dois no intrão 5 (rs11196205e rs12255372) (figura 2.4) para as amostras referidas a cima. Para tal, cada polimorfismo em estudo foi amplificado utilizando diferentes pares de *primers*, desenhados pelo grupo

de Gastrenterologia da UIPM. As reações de PCR foram otimizadas para cada fragmento e as amostras amplificadas como descrito no ponto 2.3. De seguida, foi efetuada sequenciação de Sanger para todas as amostras como descrito no ponto 2.4. Os *primers* utilizados, assim com as condições de PCR utilizadas para amplificar cada polimorfismo em estudo, encontram-se descritos no anexo IV.

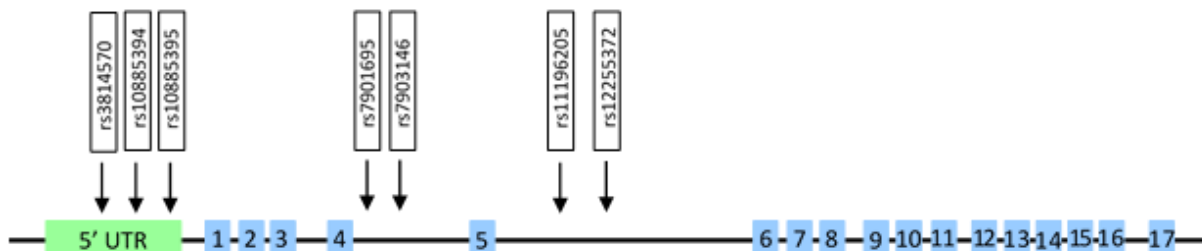


Figura 2.4 - Representação esquemática da localização dos polimorfismos do gene *TCF7L2* analisados neste estudo.

2.9 Análise de expressão de junções do gene *TCF7L2*

As reações de qPCR foram realizadas para as junções do gene *TCF7L2* nas amostras acima referidas. Após otimização, as reações foram realizadas em triplicado, numa placa de 96 poços (*ABI™ Optical 96 Well Reaction Plate*) para um volume final de 15µL como descrito em 2.6.1 com a quantidade de DNA e concentração de *primers* otimizado. O gene utilizado como referência foi o *SDHA*, e como amostra controlo foi utilizado cDNA proveniente de um indivíduo súdavel. Os valores de Ct obtidos foram depois exportados para uma folha Excel e a expressão de análise relativa foi calculado como descrito no ponto 2.6. Após a análise de expressão foi realizada uma análise estatística através do programa *GraphPad Prism software* (versão 7.03). Os *primers* utilizados e as condições utilizadas na reação estão descritos no anexo IV.

2.10 Cultura celular

A manutenção das linhas celulares foi efetuada em frascos de cultura (*t-flasks*) de 25 cm² (T25) ou 75 cm² (T75) (*Sarstedt* e *VWR*), utilizando meio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM) (*Gibco™, Life Technologies, USA*), suplementado com: 10% (v/v) de soro fetal de bovino (FBS) (*Gibco™, Life Technologies, USA*), inativado pelo calor, 1% (v/v) de L-Glutamina (200mM, *Gibco™, Life Technologies, USA*) e 1% (v/v) Penicillina-Streptomina 100x (PenStrep) (*Gibco™, Life Technologies, USA*). A este meio denominou-se meio completo. As células foram incubadas numa atmosfera húmida controlada de 5% (v/v) de CO₂ a 37°C. As células em cultura foram observadas regularmente, onde de se verificou a morfologia celular assim como a sua confluência através de um microscópio ótico de invertido (OLYMPUS CK2).

2.10.1 Linhas celulares

A cultura celular permite cultivar e/ou manter células em condições controladas. Na realização dos ensaios celulares foram utilizadas as linhas celulares de CCR LoVo e SW480 que

representam diferentes vias de tumorigénese e diferentes subtipos de tumor (CMS1 e CMS4, respetivamente). No anexo V encontram-se representadas as principais alterações das linhas utilizadas neste estudo.

2.10.2 Subcultura celular

A passagem de células para frascos de cultura foi realizada, normalmente, duas vezes por semana quando estas apresentavam uma confluência de 80-90%. Após a remoção do meio de cultura dos frascos T25 ou T75 as células foram lavadas com 3mL ou 5 mL, respetivamente, de *Dulbecco's phosphate buffered saline 1x* (DPBS) (*lonza*). Este passo permite remover vestígios de FBS, que podem interferir com a ação da tripsina. Após a lavagem foi adicionado 1mL ou 3 mL de tripsina 0,1% (v/v) (em PBS) (*Invitrogen™*) aos frascos T25 ou T75, respetivamente, seguido de incubação dos frascos de cultura na estufa de cultura a 37°C e 5% (v/v) de CO₂, durante aproximadamente 5 minutos, de modo a ativar a enzima e destabilizar as ligações célula-célula e célula-substrato (superfície de crescimento dos frascos). Após o destacamento celular foram adicionados 4 mL ou 7 mL de meio completo aos frascos T25 e T75, respetivamente, de modo a inativar a ação da enzima. Por último, procedeu-se à transferência de parte das células para o mesmo *T-flask* ou para um *T-flask* novo no rácio de subcultura desejado (que variou normalmente entre 1:3 e 1:7 consoante o planeamento dos ensaios) e à qual foi adicionado meio completo, seguido de homogeneização e incubação na estufa de cultura. A restante suspensão celular foi utilizada para a realização dos ensaios ou quando não foi necessária foi descartada ou criopreservada.

2.10.3 Criopreservação celular

De modo a preservar as características celulares e a viabilidade celular, a criopreservação deve ser efetuada quando as células se encontram na fase exponencial (aproximadamente 75% de confluência) e o número de passagens até então seja reduzido. Após tripsinização e ressuspensão das células em meio completo, como referido anteriormente, a suspensão celular foi centrifugada a 125g durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspendido em FBS suplementado com 10% (v/v) de dimetil sulfoxido (DMSO) (*Panreac*), que atua como agente crioprotetor impedindo que as células rebentem quando são congeladas. De modo geral, a partir de um T25 e T75 são congelados 1 ou 3 *cryovials* (*Abdos*), respetivamente, contendo cada um 1mL de células em meio de congelação. O congelamento celular foi efetuado lentamente por forma a garantir o efeito crioprotetor do DMSO, impedindo a formação de cristais que poderiam eventualmente danificar as células. De modo a garantir uma congelação gradual, as células foram primeiramente armazenadas a -80°C durante pelo menos um dia e, por fim, armazenados em azoto líquido.

2.10.4 Descongelação celular

A descongelação celular foi efetuada rapidamente uma vez que o DMSO é tóxico para as células à temperatura ambiente. Para tal, as células que se encontravam armazenadas em azoto líquido, foram primeiramente colocadas em gelo e depois descongeladas à temperatura de 37°C.

Posteriormente, as células foram ressuspensas em 9 mL de meio completo (previamente aquecido a 37°C, num *falcon* de 15mL) de modo a que o DMSO fosse diluído. As células foram depois centrifugadas a 125g durante 8 minutos, descartando-se posteriormente o sobrenadante. O *pellet* de células foi ressuspensado em 1 mL de meio completo e a suspensão celular foi transferida para um frasco T25, contendo já 4mL de meio completo incubado previamente nas condições anteriormente descritas durante alguns minutos, para equilibrar a temperatura e o pH do meio.

2.10.5 Contagem de células

Sempre que foi necessário obter-se uma concentração celular específica para a realização de ensaios celulares procedeu-se à contagem do número de células presentes em solução, após inativação da tripsina. Antes de se ter procedido à contagem das células, a suspensão celular foi homogeneizada para que não houvesse qualquer formação de aglomerados celulares que pudessem dificultar e/ou influenciar o processo de contagem. Num tupo *ependorf* estéril adicionaram-se 20µL da suspensão celular e 80 µL da solução *Trypan Blue Stain* 0,4% (*Gibco™, Invitrogen Corporation*). Este corante foi usado com o intuito de distinguir células não-viáveis e células viáveis, uma vez que apenas as células não-viáveis ficam coradas de azul devido a danos na membrana celular. Posteriormente, foram transferidos 10 µL da solução anteriormente preparada para ambos os lados de uma câmara de *Neubauer*. De modo a evitar contagens repetidas, apenas foram consideradas as células que se encontravam dentro e no limite superior e esquerdo (figura 2.5). A concentração celular foi obtida através da equação 7:

$$\text{Concentração celular} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\sum \text{células por quadrante}}{8} * 10^4 (\text{constante da câmara}) * 5 (\text{fator de diluição}) \quad (\text{Equação 7})$$

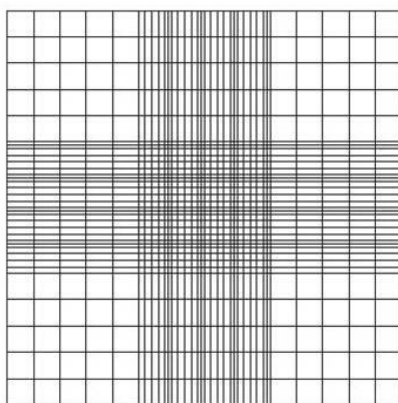


Figura 2.5 - Esquema da câmara de Neubauer

Retirado de: retirado de: <http://www.splabor.com.br> (acedido em: 10/06/2018)

2.10.6 Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram efetuados nas linhas celulares LoVo e SW480. Após contagem celular, preparou-se uma suspensão celular à concentração de 100.000 células/mL de meio completo. De seguida, em placas de cultura de 96 poços (VWR e *Sarstedt*), adicionados 100µL/poço dessa suspensão celular de modo a obter uma densidade celular de 1×10^4 células/poço,

adicionando igual volume de água estéril aos poços periféricos de cada placa. As placas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% (v/v) CO₂ e após 24h de incubação as células foram tratadas com diferentes doses dos compostos de interesse preparadas em diluições seriadas. Informações relativas a cada fármaco encontram-se descritas no anexo VI. Para cada ensaio foram utilizados dois controlos, um controlo de viabilidade celular (células incubadas apenas em meio de cultura) e um controlo para o solvente em que cada composto/fármaco se encontra diluído (células incubadas em meio com a maior % (v/v) de solvente, equivalente à dose mais elevada de composto). Após 24h de incubação nas condições supra-mencionadas, a viabilidade celular foi determinada através de um ensaio colorimétrico usando o *kit Cell Proliferation Reagent (WST-1)* (Roche®). Este ensaio baseia-se na atividade metabólica celular da enzima dependente de NAD(P)H através da clivagem do sal tatrazolio WST-1 (de cor amarelada) em *Formazan* solúvel. Esta bio-redução é dependente da produção de NAD(P)H nas células viáveis e, desta maneira, a quantidade de *Formazan* produzido está diretamente relacionado com a viabilidade celular.

Para tal, descartou-se o meio da placa (com as diferentes condições) e realizou-se uma lavagem com 100µL/poço de DPBS. De seguida foram adicionados 100 µL/poço de reagente WST-1 diluído em meio completo na razão de 1:20, realizando o mesmo procedimento para alguns poços periféricos, condição que servirá como controlo para subtração da absorvância “background”. As células foram incubadas durante 3h, nas condições previamente mencionadas. Por fim, procedeu-se à agitação das placas e à leitura da absorvância a comprimentos de onda de 450nm (comprimento de onda usado para medir a clivagem do WST-1) e 750nm (valor utilizado para normalizar as leituras) usando um leitor de placas (*Bio-Rad*). Aos valores de absorvância foi subtraída a absorvância “background” e a viabilidade celular foi calculada relativamente ao controlo (células incubadas apenas em meio). A partir dos resultados obtidos foi calculado o valor do IC₅₀ (concentração de fármaco necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular) para cada composto, com recurso ao *software GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (*GraphPad Software*, Califórnia USA). Os resultados foram representados como a média de pelo menos duas experiências independentes realizadas em triplicado.

2.10.7 Ensaio de migração celular

Os ensaios de migração celular foram realizados para as linhas celulares SW480 e LoVo. Para a realização destes ensaios, as linhas celulares foram colocadas em cultura em placas de 12 poços (*Sarstedt*) a uma densidade de 2x10⁵ células/poço, seguido de incubação nas condições supra-referidas até atingirem uma confluência a 80-90%. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi descartado, seguido de lavagem da monocamada celular com 1mL/poço de DBPS e adição de 1mL/poço de meio DMEM suplementado com 0.5% (v/v) de FBS (*Gibco*™, *Life Technologies*, USA), 1% (v/v) L-Glutamina (200mM *Gibco*™, *Life Technologies*, USA) e 1% (v/v) Penicilina-Streptomicina (*Gibco*™, *Life Technologies*, USA), nas condições anteriormente descritas. Este meio de cultura, também denominado meio *starvation*, contém apenas uma percentagem mínima de soro

que limita o crescimento celular contrariamente ao meio completo, de forma a assegurar que o fecho do risco/ferida ocorre devido à migração celular e não devido à proliferação celular.

Após 24h, foi realizado um risco em cada poço com auxílio de uma ponta estéril de 100µL, criando assim uma fenda/"ferida" na monocamada celular. De seguida, o meio foi descartado e a monocamada foi lavada três vezes com DPBS. Por fim, foram adicionados os compostos em estudo diluídos em meio *starvation*, seguindo-se incubação nos parâmetros já descritos. As concentrações dos compostos utilizados foram inferiores ao valor de IC₅₀ obtidos para cada composto nos ensaios de viabilidade celular, para garantir que o efeito observado se deve exclusivamente à migração. Após 24h de incubação o meio foi descartado, os poços foram lavados uma vez com 1mL/poço de DPBS e, por fim, foi adicionado 1mL/poço de meio *starvation*. Cada poço foi fotografado em três posições diferentes às 0h (dia do tratamento) e às 24h e 48h após tratamento, utilizando um microscópio invertido *OLYMPUS IX53* (*Olympus Corporation*) e o programa *OLYMPUS CellSens Standard 1.17* (*Olympus Corporation*). A área correspondente ao risco foi calculada utilizando o programa *Fiji* (*Fiji Is Just ImageJ*) e a taxa de migração foi calculada para cada período de tratamento relativamente ao controlo sem tratamento, de acordo com a equação 8.

$$\text{Taxa de migração \%} = 100 - \left(\frac{100 \cdot \text{área do risco da amostra (células tratadas com composto)}}{\text{área do risco do controlo (células incubadas em meio)}} \right) \text{ (Equação 8)}$$

Os resultados foram representados como a média de pelo menos duas experiências independentes realizadas em triplicado

2.11 Análise da expressão de genes envolvidos na *stemness*, EMT e vias de sinalização específicas

A análise de expressão nas linhas celulares SW480 e LoVo foi realizada por RT-qPCR para avaliar a capacidade de determinados compostos modularem a expressão de marcadores envolvidos na progressão tumoral do CCR, nomeadamente na proliferação/ciclo celular, EMT, *stemness* e vias de sinalização SHH e TGF-β. Após otimização, as reações foram realizadas em placas de 96 poços (*ABI Prism™ Optical 96 Well Reaction Plate*) para um volume final de 15µL. Os genes analisados assim como os *primers* utilizados para cada gene encontram-se descritos no anexo IV. Como gene controlo foi utilizado o GAPDH.

2.12 Análise estatística

Os resultados obtidos para as frequências dos polimorfismos foram analisados com o auxílio do *software SISA*, através do teste *Fisher 2 by 5*. A análise estatística dos resultados obtidos, para o ensaio de migração celular, foi realizada com o auxílio do *software GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*). A comparação entre amostras com mais de duas variáveis foi realizada segundo a análise *Two-way ANOVA*. Valores de *p* <0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3 Resultados e discussão

3.1 Análise do genótipo de polimorfismos do gene *TCF7L2*, em indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda, associado ao risco familiar.

Neste estudo, foram analisados os polimorfismos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 do gene *TCF7L2*, localizados na região *upstream* do exão 1, em 47 amostras de DNA de tumor ou de mucosa cólica normal/sangue periférico de doentes que preenchem pelo menos um dos CB (doentes CB) (tabela 3.1). Os resultados foram adicionados aos obtidos previamente para um conjunto de 215 amostras de DNA (também provenientes de tumor ou de mucosa cólica normal/sangue periférico), perfazendo um total de 262 amostras emparelhadas (DNA de tumor e respetivo DNA constitutivo-mucosa cólica normal ou sangue periférico) de 131 doentes (anexo VII, tabela VII.1). As frequências de cada genótipo nestes 131 doentes, para cada polimorfismo, são apresentadas na tabela 3.2. Em alguns doentes observaram-se diferenças entre o genótipo obtido para a mucosa normal/sangue periférico e o genótipo obtido para o tumor, as quais serão referidas e discutidas mais adiante.

Comparando as frequências de cada genótipo, obtidas para a população de doentes CB em estudo, com o reportado nas bases de dados populacionais, observaram-se diferenças significativas. De facto, observou-se uma maior frequência de homozigotia para o alelo normal, a qual parece ser compensada por uma menor frequência de heterozigotia, no grupo de doentes CB relativamente às mesmas frequências observadas na população ibérica para os 3 polimorfismos em estudo: 87/131 (66,4%) vs. 47/107 (41,1%) e 37/131 (28,2%) vs. 45/107 (42,1%) para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, no caso do rs3814570 ($p=0.001$); 89/131 (67,9%) vs. 50/107 (46,7%) e 34/131 (25,9%) vs. 44/107 (41,1%), também para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para ambos os rs10885394 e rs10885395, ($p=0.003$).

Observou-se, também, uma maior frequência de homozigotia para o alelo normal, a qual parece ser compensada por uma menor frequência de heterozigotia, no grupo de doentes CB relativamente às mesmas frequências observadas na população europeia para os 3 polimorfismos em estudo: 87/131 (66,4%) vs. 243/503 (48,3%) e 37/131 (28,2%) vs. 211/503 (41,9%) para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, no caso do rs3814570 ($p=0.001$); 89/131 (67,9%) vs. 253/503 (50,3%) e 34/131 (25,9%) vs. 207/503 (41,4%), para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para o rs10885394 ($p=0.001$) e 89/131 (67,9%) vs. 252/503 (50%) e 34/131 (25,9%) vs. 208/503 (41,4%), para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para o rs10885395 ($p=0.001$).

Comparando as frequências de cada genótipo, obtidas para a população de doentes CB em estudo, com o reportado nas bases de dados populacionais, para a população mundial, não se observaram diferenças significativas: 87/131 (66,4%) vs. 1749/2504 (69,8%) e 37/131 (28,2%) vs. 649/2504 (25,9%) para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, no caso do rs3814570 ($p=0.66$); 89/131 (67,9%) vs. 1868/2504 (74,6%) e 34/131 (25,9%) vs. 552/2504 (22%), para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para o rs10885394 ($p=0.116$) e

89/131 (67,9%) vs. 1866/2504 (74.5%) e 34/131 (25,9%) vs. 554/2504 (22.1%), para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para o rs10885395 ($p= 0.1196$).

Deste modo, a frequência dos polimorfismos na população mundial é diferente da reportada para a população ibérica e europeia. Uma observação mais detalhada das frequências destes polimorfismos, nas diferentes populações, revela uma frequência de homozigotia para o alelo normal muito elevada e uma frequência de heterozigotia muito baixa nas populações asiática de este e africana, 89.5%, 10.1% e 85%, 14.4% para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para o rs3814570 e 91.5%, 8.3% e 96.4%, 23.5% para as frequências de homozigotia e heterozigotia, respetivamente, para ambos os rs10885394 e rs10885395. Assim sendo, a aproximação das frequências observadas na população mundial às observadas na população de doentes em estudo (doentes CB) deve-se à inclusão destas populações.

No entanto, a população de doentes CB não contém indivíduos asiáticos nem africanos. Deste modo, colocou-se a hipótese das diferenças observadas na nossa população de estudo em relação às populações europeia e ibérica se deverem a uma diferente frequência dos genótipos na população portuguesa. Assim, de modo a avaliarmos esta hipótese, foi efetuado o estudo destes polimorfismos numa população de indivíduos controlo da população portuguesa (anexo VII, tabela VII.2).

Uma vez que os 3 polimorfismos formam um haplotipo, sendo herdados normalmente em conjunto, tendem a apresentar o mesmo genótipo salvo muito raras exceções, assim, de modo a simplificar a descrição e a análise estatística, considerou-se o resultado global do genótipo para o haplotipo correspondente ao rs3814570, rs10885394 e rs10885395 em 128 doentes CB (Tabela 3.3). Procedeu-se da mesma forma para o grupo de 94 indivíduos controlo da população portuguesa.

Comparando as frequências de cada genótipo, obtidas para a população de doentes CB em estudo, com a frequência obtida para indivíduos controlo da população portuguesa, observaram-se diferenças significativas, semelhantes ao observado para a população ibérica e europeia. Assim sendo, observou-se, também, uma maior frequência de homozigotia para o alelo normal, a qual parece ser compensada por uma menor frequência de heterozigotia, no grupo de doentes CB relativamente às mesmas frequências observadas na população portuguesa para os 3 polimorfismos em estudo: 87/128 (68%) vs. 47/94 (44%) ($p= 0.02$). Estes resultados sugerem que a diferença na frequência dos polimorfismos nos doentes CB possa estar associada ao desenvolvimento de CCR ou mesmo ao aumento do risco de CCR associada aos CB.

De modo a clarificar esta associação foi analisada a frequência dos polimorfismos num grupo de doentes com CCR esporádico (idade de diagnóstico igual ou superior a 60 anos), sem critérios para classificação de CB e sem evidências de apresentarem um risco aumentado para CCR devido a história pessoal ou familiar de CCR. Neste grupo, as frequências dos genótipos continuam a ser semelhantes às populações controlo portuguesa, ibérica e europeia (tabela 3.3.). O facto das frequências nos indivíduos com CCR esporádico não serem semelhantes aos indivíduos que preenchem os CB, mas sim aos controlos e à frequência descrita na população ibérica e europeia sugere que a diferença observada nos indivíduos CB não se relaciona apenas com o facto de terem CCR mas sim com o preenchimento dos CB que implicam um risco aumentado de CCR. Assim,

alterações na região *upstream* ao exão 1 poderão aumentar o risco para o desenvolvimento de CCR, numa idade jovem (CB1), para o desenvolvimento de CCR síncronos ou metacrónicos (CB2), CCR mucinoso ou infiltrado Crohn-like (CB3), ou para a existência de 2 ou 3 casos de CCR na família (CB4 e 5).

A redução da frequência de heterozigotia e aumento da frequência de homozigotia para o alelo normal leva-nos a colocar a hipótese de que a perda de heterozigotia ou a homozigotia para o alelo normal se relacionar com um aumento do risco para CCR.

Curiosamente alguns dos indivíduos em estudo pareceram apresentar um sinal mais baixo na sequenciação de Sanger para um dos alelos, ou seja, não parecem completamente heterozigóticos nem homozigóticos. Como se pode observar na tabela 3.1, alguns indivíduos (a mucosa normal do indivíduo CAS2882, a amostra de DNA do tumor e de sangue periférico do indivíduo CAS2525, CAS2526s, e o tumor do indivíduo CAS455) apresentam um desequilíbrio alélico para a heterozigotia para o polimorfismo, representado pela letra em minúsculo. Apesar de não se ter aferido quantitativamente esta situação, as diferenças nas intensidades dos picos relativamente aos casos heterozigóticos (os dois alelos apresentam-se numa proporção aproximadamente de 50:50) são bastante evidentes quanto a este desequilíbrio alélico (Figura 3.1). Assim sendo, colocou-se a hipótese de a nível somático, na mucosa normal, ou mesmo a nível germinal, ocorrer perda de heterozigotia e isso justificar a menor frequência de heterozigóticos e maior frequência de homozigotia observada nos indivíduos CB em relação aos restantes grupos controlo.

Caso se comprove esta associação numa maior amostragem de doentes CB e esporádicos a análise do genótipo para os polimorfismos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 do gene *TCF7L2* poderá ser sugestiva de um aumento do risco para CCR. Será interessante averiguar se a homozigotia nestes casos em concreto leva a um aumento da expressão do gene *TCF7L2* ou de genes alvos da via Wnt.

A cinzento encontram-se marcados os genótipos heterozigóticos, a preto os homozigóticos para o alelo normal e a vermelho para o alelo polimórfico

A cinzento encontram-se marcados os genótipos heterozigóticos, a preto os homozigóticos para o alelo normal e a vermelho para o alelo polimórfico

Tabela 3.1- Genótipo dos polimorfismos analisados, localizados na região upstream do exão 1, em tumores e respetiva mucosa normal de indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda e indivíduos com CCR esporádico.

Amostra	rs38145570 (-2006 pb)*	rs10885394 (- 1728 pb)	rs10885395 (- 1248 pb)
	Alelo normal:		
	Alelo C	Alelo T	Alelo C
CAS2914	C/C	T/T	C/C
CAS2882	C/t	T/A	C/T
CAS2881	C/T	T/A	C/T
CAS2846	C/C	T/T	C/C
CAS2845	C/C	T/T	C/C
CAS2526s	c/T	A/A	T/T
CAS2525	C/t	A/A	T/T
CAS2455	C/C	T/T	C/C
CAS2270	C/T	T/A	C/T
CAS2269	C/T	T/A	C/T
CAS2230	C/C	T/T	C/C
CAS2198	C/T	T/A	C/T
CAS2094	C/T	T/A	C/T
CAS2016	T/T	A/A	T/T
CAS2015	T/T	A/A	T/T
CAS1988	C/C	T/T	C/C
CAS1978S	C/C	T/T	C/C
CAS1977	C/C	T/T	C/C
CAS1974S	C/T	T/A	C/T
CAS1973	C/C	T/T	C/C
CAS1936	C/C	T/T	C/C
CAS1928	C/T	T/A	C/T
CAS1927	C/T	T/A	C/T
CAS1924	C/C	T/T	C/C
CAS1923	C/C	T/T	C/C
CAS1914	C/T	T/A	C/T
CAS1913	C/T	T/A	C/T
CAS1910	C/T	T/A	C/T
CAS1909	C/T	T/A	C/T
CAS1877	C/T	T/A	C/T
CAS1708	C/C	T/T	C/C
CAS1653	C/T	T/T	C/C
CAS1640	C/C	T/T	C/C
CAS849	C/C	T/T	C/C
CAS817	C/T	T/A	C/T
CAS786	C/C	T/T	C/C
CAS720	C/C	T/T	C/C
CAS712	C/T	T/A	C/T
CAS603	C/T	T/A	C/T
CAS585	C/C	A/A	C/C
CAS489	C/T	T/A	C/T
CAS479	C/T	T/A	C/T
CAS471	C/T	T/A	C/T
CAS455	C/t	T/T	C/C
CAS301	C/C	T/T	C/C
CAS255	C/T	T/A	C/T
CAS181	C/T	T/A	C/T
CAS48	C/C	T/T	C/C
CAS47	C/C	T/T	C/C
CAS40	C/t	T/a	C/t
CAS39	C/t	T/a	C/t
CAS37	C/t	T/a	C/t

* - Posição relativa ao ATG. A cinzento encontram-se representados os resultados de heterozigotia para os polimorfismos, a preto homozigotia para o alelo mais frequente (normal) e a vermelho homizgotia para o polimorfismo. A sombreado encontram-se representeados os resultados referentes às amostras de doentes com CCR esporádico. As letras a minúsculo representam um desequilíbrio alélico para a heterozigotia para o polimorfismo (ganho ou perda de um dos alelos, polimórfico ou normal).

Tabela 3.2 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos, localizados upstream do exão 1, do gene TCF7L2 para os indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda (doentes CB), para doentes com CCR esporádico, para indivíduos controle da população portuguesa, assim como para a frequência na população Ibérica, europeia e mundial.

	rs3814570			rs10885394			rs10885395		
	Nor. (C/C)	Het. (C/T)	Hom. (T/T)	Nor. (T/T)	Het. (T/A)	Hom. (A/A)	Nor. (C/C)	Het. (C/T)	Hom. (T/T)
Frequência de cada genótipo para o polimorfismo nos doentes CB	87/131 (66,4%)	37/131 (28,24%)	7/131 (5,3%)	89/131 (67,9%)	34/131 (25,9%)	8/131 (6,10%)	89/131 (67,9%)	34/131 (25,9%)	8/131 (6,1%)
Frequência de cada genótipo para os polimorfismos na população Ibérica*	47/107 (43,9%)	45/107 (42,1%)	15/107 (14%)	50/107 (46,7%)	44/107 (41,1%)	13/107 (12,1%)	50/107 (46,7%)	44/107 (41,1%)	13/107 (12,1%)
Frequência de cada genótipo para o polimorfismo na população europeia*	243/503 (48,3%)	211/503 (41,9%)	49/503 (9,7%)	253/503 (50,3%)	207/503 (41,2%)	43/503 (8,5%)	252/503 (50,1%)	208/503 (41,4%)	43/503 (8,5%)
Frequência de cada genótipo para o polimorfismo na população mundial* a)	1749/2504 (69,8%)	649/2504 (25,9%)	106/2504 (4,2%)	1868/2504 (74,6%)	552/2504 (22%)	84/2504 (3,4%)	1866/2504 (74,5%)	554/2504 (22,1%)	84/2504 (3,4%)
Frequência de cada genótipo para o polimorfismo nos indivíduos controle da população portuguesa	47/94 (50%)	40/94 (42,55%)	7/94 (7,45%)	47/94 (50%)	40/94 (42,55%)	7/94 (7,5%)	47/94 (50%)	40/94 (42,55%)	7/94 (7,45%)
Frequência de cada genótipo para o polimorfismo nos indivíduos com CCR esporádico	8/16 (50%)	8/16 (50%)	0/16 (0%)	8/16 (50%)	8/16 (50%)	0/16 (0%)	8/16 (50%)	8/16 (50%)	0/16 (0%)

*adquirido na base de dados Ensembl (GRCh38.p12), disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html> (Acedido em: 20/08/2018).

Het. – Heterozigóticos; Hom. – Homozigóticos para o alelo polimórfico; Nor. – Homozigóticos para o alelo normal.

a) A frequência dos polimorfismos na população mundial é afetada pela frequência na população africana e pela frequência na população do este da Ásia

Tabela 3.3 - Frequência do genótipo para o haplotipo correspondente aos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 nos doentes que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda (doentes CB).

	Haplotipo correspondente aos rs3814570, rs10885394 e rs10885395		
	Nor.	Het.	Hom.
Frequência dos genótipos para o haplotipo nos doentes CB	87/128 (67,9%)	34/128 (26,5%)	7/128 (5,5%)
Frequência dos genótipos para o haplotipo nos indivíduos controle da população portuguesa	40/94 (42,55%)	47/94 (50%)	7/94 (7,45%)
Frequência dos genótipos para o haplotipo nos indivíduos com CCR esporádico	8/16 (50%)	8/16 (50%)	0/16 (0%)

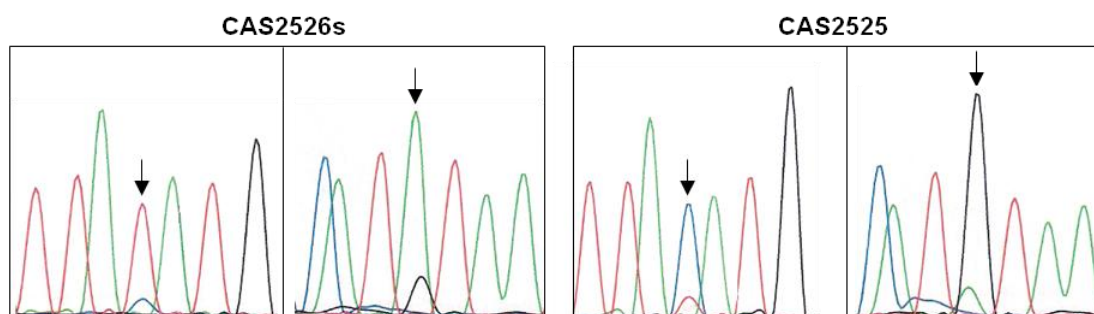


Figura 3.1 - Imagem representativa da análise do polimorfismo rs3814570 do gene *TCF7L2*, na amostra extraída de sangue periférico (CAS2526s) e na amostra extraída de tumor incluído em parafina (CAS2525) de um indivíduo que preencheu pelo menos um dos critérios de Bethesda. Para cada polimorfismo é apresentada a sequência obtida com o primer 5' e com o primer 3'. As setas indicam um desequilíbrio alélico para a heterozigotia para o polimorfismo (ganho ou perda de um dos alelos, polimórfico ou normal).

3.2 Análise do genótipo de polimorfismos do gene *TCF7L2*, em indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTX-like e linhas celulares CCR, como um fator de impacto na expressão de isoformas

Nesta parte do trabalho, foi avaliado o genótipo dos polimorfismos localizados *upstream* do exão 1, em indivíduos FCCTX/FCCTX-like que preenchem os CB 4 e 5 e que por isso estão associados a um risco aumentado de CCR, devido à história familiar. Pretendeu-se ainda relacionar os genótipos obtidos com a expressão de *TCF7L2* correspondente, nomeadamente de algumas das suas isoformas. Devido à associação de alguns polimorfismos nos intrões 4 e 5 ao risco de CCR em alguns estudos populacionais (Chen *et al.*, 2013; Ngoi *et al.*, 2008), principalmente o rs7903146 no intrão 4, também foram analisados para estes doentes os polimorfismos no intrão 4 (rs790885695 e rs7903146) e intrão 5 (rs11196205 e rs12255372). Esta análise já tinha sido iniciada em 20 doentes índice de famílias FCCTX/FCCTX-like (doentes FCCTX) no decorrer de um estudo prévio realizado pelo grupo de Gastroenterologia da UIPM e no presente trabalho foram analisados 10 doentes FCCTX adicionais (tabela 3.4).

Para a análise das frequências dos genótipos dos polimorfismos, os resultados obtidos para os 10 indivíduos analisados neste estudo, foram adicionados aos resultados obtidos em 20 doentes FCCTX que tinham sido anteriormente analisados, pelo grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG), perfazendo um total de 30 indivíduos analisados (anexo VII - tabela VII.3).

Comparando as frequências de cada genótipo (tabela 3.5), obtidas para a população de doentes FCCTX em estudo, com o reportado nas bases de dados populacionais para a população ibérica e europeia, não se observaram diferenças significativas entre a frequência dos genótipos dos polimorfismos em estudo, tanto para os localizados *upstream* do exão 1 como para os polimorfismos localizados nos intrões 4 e 5.

Tabela 3.4 - Genótipo dos polimorfismos analisados, localizados na região upstream do exão 1 e nos intrões 4 e 5, em indivíduos índice de famílias FCCTX ou FCCTX-like (critérios Bethesda 4 e 5) e nas linhas de CCR em estudo.

Amostra	Upstream exão 1			Intrão 4		Intrão 5	
	rs3814570	rs10885394	rs10885395	rs7901695	rs7903146	rs11196205	rs12255372
	Alelo normal:						
	C	T	C	T	C	G	G
L2219	C/T	T/A	C/T	T/T	C/C	G/C	G/G
L1513	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
L1501	C/T	T/A	C/T	T/T	C/T	G/C	G/T
L1490	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
L1310	C/T	T/A	C/T	C/C	T/T	C/C	T/T
L2208	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/T
E436	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/C	G/G
L2141	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/T
L2153	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/T
L108	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	G/G
LoVo	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
HT29	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	g/T	g/T
SW48	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/T	G/T
HCT116	T/T	A/A	T/T	c/T	C/t	C/C	G/t
LS174T	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	C/C	G/T
SW480	T/T	A/A	T/T	T/C	C/T	G/C	G/T

A cinzento encontram-se marcados os genótipos heterozigóticos, a preto os homozigóticos para o alelo normal e a vermelho para o alelo polimórfico

Dispondo de RNA destes doentes, foi então avaliado se existia alguma relação entre a diferente distribuição dos genótipos dos polimorfismos e a expressão do gene *TCF7L2* ou de algumas isoformas, e em que medida os polimorfismos poderiam contribuir para o aumento do risco de desenvolver CCR.

Deste modo, realizou-se uma análise de expressão por RT-qPCR do gene *TCF7L2* para as junções 1-2, 3-4, 3-5 e 7-8 (Figura 3.2). Como os exões 7 e 8 não sofrem *splicing* alternativo a junção 7-8 funcionou, de certa forma, como controle de expressão global. A análise da expressão da junção 1-2 pretendeu perceber se os polimorfismos *upstream* do exão 1 teriam alguma influência na expressão das isoformas contendo estes exões. Já a análise da junção 3-4 pretendeu perceber a expressão de isoformas que contêm o exão 4 e a análise da junção 3-5 pretendeu analisar a expressão de isoformas que não compreendem o exão 4, previamente associadas a um potencial papel no processo de EMT.

Verificou-se que os doentes L2161 e L2208 apresentaram uma menor expressão da junção 1-2 quando comparada com as outras junções. Já os doentes L2156, CAS1964s e L1310 apresentaram uma expressão reduzida, de uma maneira geral, para todas as junções incluído a junção 1-2. Nos indivíduos L2141, L2186, L5 e L2195 observou-se o contrário sendo que a expressão do 1-2 foi maior que a das restantes junções, curiosamente, nestes últimos 4 doentes, não se verificou nenhum heterozigótico para os polimorfismos *upstream* do exão 1.

Quando se comparou a expressão da junção 3-4 com a 3-5 verificou-se, de uma maneira geral, que a expressão da junção que não compreende o exão 4 foi mais elevada do que a que compreende o exão 4, exceto para os indivíduos L1310, L2186, L2141.

Tendo em conta os indivíduos analisados não pareceu haver correlação entre os genótipos dos polimorfismos em estudo e a expressão das isoformas que não contêm o exão 4. Quando se comparou os resultados obtidos com a informação clínica disponível para cada indivíduo também não foi possível retirar conclusões. É de lembrar que esta análise de expressão foi apenas preliminar e que será necessário um número maior de doentes para se poderem retirar conclusões.

Tabela 3.5 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos, localizados upstream do exão 1 e nos intrões 4 e 5 do gene *TCF7L2* para os indivíduos index de famílias FCCTX/FCCTC-like, assim como a frequência na população Ibérica, europeia e mundial.

Polimorfismos	Frequência de cada genótipo para os polimorfismos nos doentes FCCTX/FCCTC-like			Frequência de cada genótipo para os polimorfismos na população ibérica*			Frequência de cada genótipo para os polimorfismos na população europeia*		
	Nor.	Het.	Hom.	Nor.	Het.	Hom.	Nor.	Het.	Hom.
rs3814570	14/30 (46,7%)	15/30 (50%)	1/30 (3,3%)	47/107 (43,9%)	45/107 (42,1%)	15/107 (14%)	243/503 (48,3%)	211/503 (41,9%)	49/503 (9,7%)
rs10885394	14/30 (46,7%)	15/30 (50%)	1/30 (3,3%)	50/107 (46,7%)	44/107 (41,1%)	13/107 (12,1%)	253/503 (50,3%)	207/503 (41,2%)	43/503 (8,5%)
rs10885395	14/30 (46,7%)	15/30 (50%)	1/30 (3,3%)	50/107 (46,7%)	44/107 (41,1%)	13/107 (12,1%)	252/503 (50,1%)	208/503 (41,4%)	43/503 (8,5%)
rs7901695	10/30 (33,3%)	15/30 (50%)	5/30 (16,7%)	28/107 (26,2%)	60/107 (56,1%)	19/107 (17,9%)	216/503 (42,9%)	222/503 (44,1%)	65/503 (12,9%)
rs7903146	9/30 (30%)	15/30 (50%)	6/30 (20%)	38/107 (35,5%)	53/107 (49,5%)	16/107 (15%)	242/503 (48,1%)	203/503 (40,4%)	58/503 (11,5%)
rs11196205	4/30 (13,3%)	19/30 (63,3%)	7/30 (23,3%)	19/107 (17,8%)	57/107 (53,3%)	31/107 (29%)	128/503 (25,4%)	259/503 (51,5%)	116/503 (23,1%)
rs12255372	11/30 (36,7%)	15/30 (50%)	4/30 (13,3%)	41/107 (38,3%)	52/107 (48,6%)	14/107 (13,1%)	258/503 (51,3%)	196/503 (39%)	49/503 (9,7%)

*adquirido na base de dados Ensembl (GRCh38.p12), disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html> (Acedido em: 20/08/2018).

Het. – Heterozigóticos; Hom. – Homozigóticos para o alelo polimórfico; Nor. – Homozigóticos para o alelo normal.

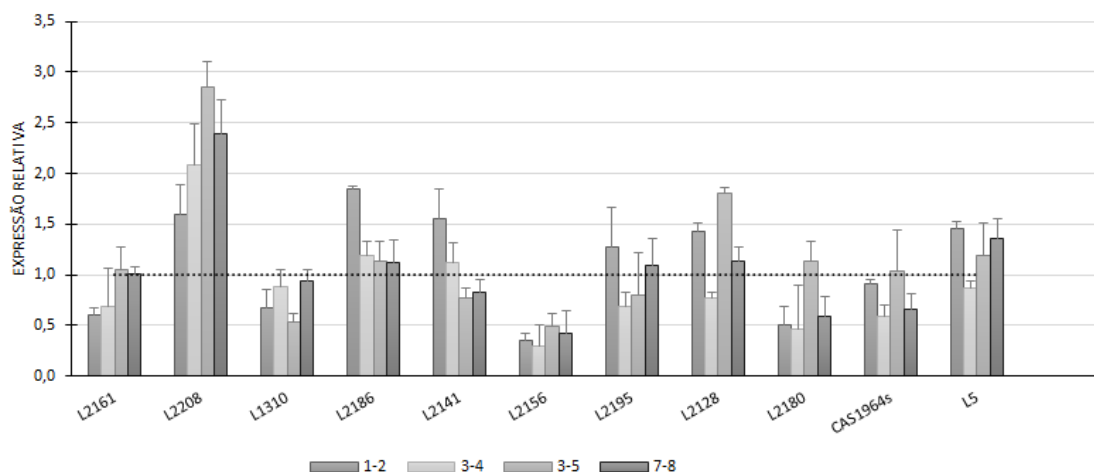


Figura 3.2 - Análise de expressão por RT-qPCR do gene TCF7L2 utilizando os primers para as junções dos exões 1-2, 3-4, 3-5 e 7-8 em RNA extraído de sangue periférico de indivíduos Índex de famílias FCCTX/FCCTX-like. A expressão das várias junções de exões para cada indivíduo foi normalizada relativamente à expressão obtida em indivíduos saudáveis (linha horizontal a tracejado) e à expressão do gene de referência SDHA.

Em relação às linhas celulares de CCR, todas as linhas, exceto a HCT116 e a LS174T, demonstraram ser heterozigóticas para os polimorfismos localizados no intrão 4 e 5, excluindo o polimorfismo rs11196205 para o qual demonstraram ser homozigóticas. Já para os polimorfismos localizados *upstream* do exão 1, os resultados indicam um padrão de polimorfismos mais heterogêneo entre as linhas, sendo que as linhas HT29, SW48 e LS174T demonstraram ser homozigóticas para o alelo normal, as linhas HCT116 e SW480 demonstraram ser homozigóticas para o alelo polimórfico e a linha LoVo foi a única que demonstrou ser heterozigótica (figura 3.3). De uma maneira geral, nas linhas celulares de CCR, parece não existir correlação entre o genótipo para os polimorfismos em estudo e o estágio de cada linha.

Interessantemente, as linhas celulares HCT116 e HT29 revelaram desequilíbrios alélicos para alguns polimorfismos. A HCT116 revelou estes desequilíbrios para todos os polimorfismos exceto para o rs11196205, uma vez que a HCT116 é homozigótica para este alelo, enquanto a HT29 apresentou desequilíbrios alélicos para os polimorfismos rs7903146 (intrão 4) e para os dois localizados no intrão 5. Curiosamente, a linha celular HT29 demonstrou ter um desequilíbrio alélico contrário à HCT116, ou seja, no caso da HT29 por exemplo, no rs7901695 o pico correspondente ao alelo normal apresenta uma maior intensidade do que o correspondente ao alelo polimórfico, enquanto na HCT116 verifica-se o contrário (figura 3.3). É de salientar que esta análise foi repetida efetuando a sequenciação a partir de nova extração de DNA das linhas, tendo-se obtido o mesmo resultado.

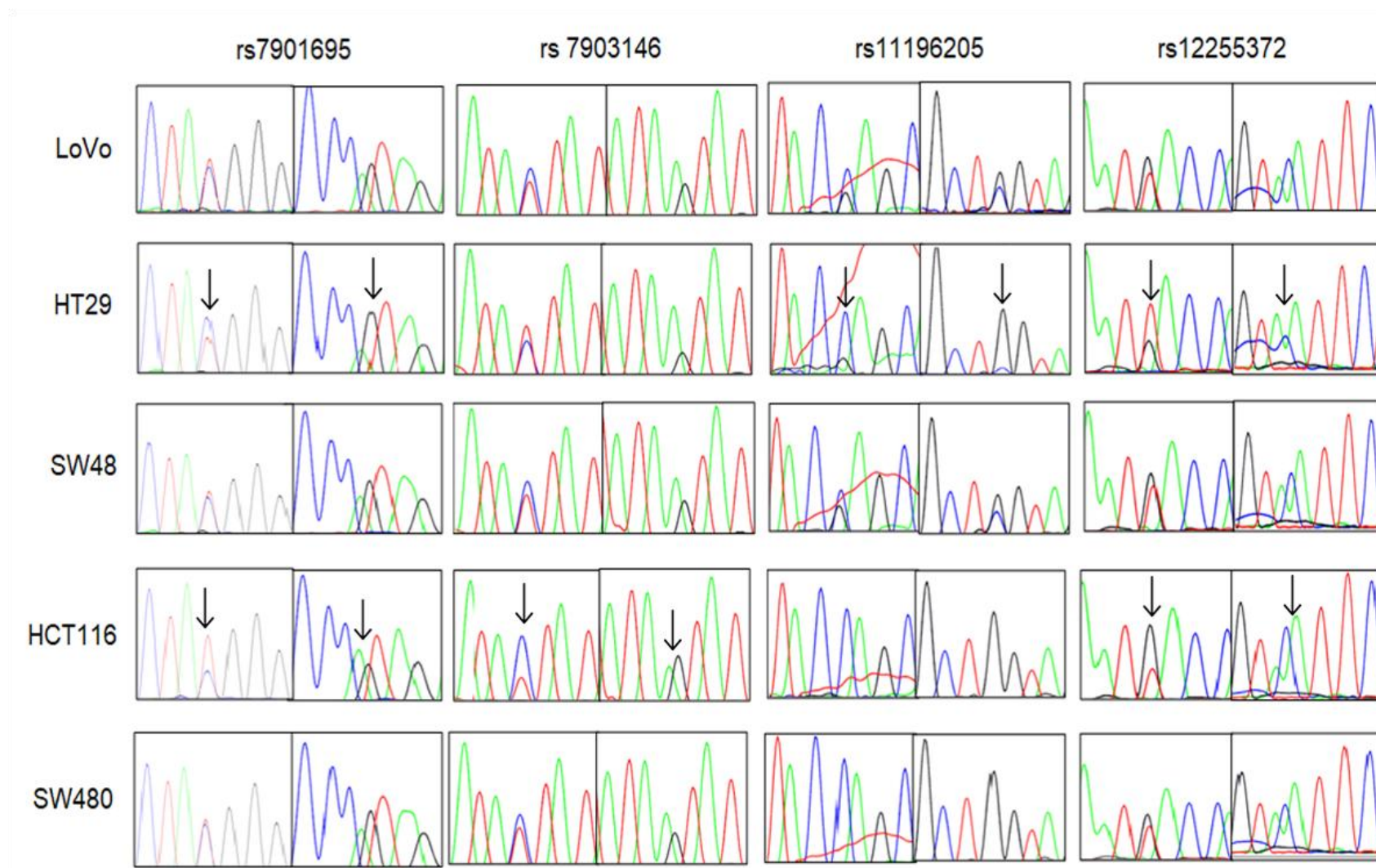


Figura 3.3 - Imagem representativa da análise dos polimorfismos estudados do gene TCF7L2, localizados nos intrões 4 e 5, nas linhas celulares de CCR, LoVo, HT29, SW48, HCT116 e SW480. Para cada polimorfismo é apresentada a sequência obtida com o primer 5' e com o primer 3'. As setas indicam os casos em que existe um desequilíbrio alélico para a heterozigotia para o polimorfismo (ganho ou perda de um dos alelos, polimórfico ou normal).

3.3 Papel das isoformas sem o exão 4 do gene *TCF7L2* no CCR

Como referido anteriormente, as isoformas do gene *TCF7L2* que não expressam o exão 4 foram associadas a uma maior capacidade de invasão e agressividade (Tomimaru *et al.*, 2014). Por forma a perceber melhor a influência destas isoformas no CCR iniciou-se um estudo preliminar envolvendo 16 amostras provenientes de 8 indivíduos (8 amostras de tumor do cólon e 8 de mucosa cólica normal) diagnosticados com CCR em estágio III, para os quais é efetuada quimioterapia adjuvante. Deste 8 indivíduos, 4 recidivaram e 4 mantiveram-se livres de doença durante os primeiros 5 anos de *follow-up* (figura 3.4).

Entre os indivíduos que recidivaram (figura 3.4 A), comparou-se a expressão da junção 3-4 com a da junção 3-5 na mucosa normal. Verificou-se que a junção 3-5 foi sempre muito mais expressa, exceto no doente CAS4067 onde se verificou o contrário. Nos tumores destes doentes verificou-se que 2 deles apresentaram uma maior expressão da junção 3-5 relativamente à 3-4 (CAS4057 e CAS4059). Curiosamente, tanto a junção 3-5 como a 3-4 foram mais expressas na mucosa normal destes doentes do que nos respetivos tumores. Ainda no grupo de doentes que recidivaram, todos apresentaram metastização à distância no fígado, com exceção do CAS4061 que se tratava de um tumor localizado na região rectosigmoide e que recidivou localmente.

Em relação à expressão da junção 3-5 na mucosa normal dos doentes sem recidiva (figura 3.4 B), esta foi sempre menos expressa que a junção 3-4, ao contrário do observado para os doentes com recidiva. Relativamente a estes doentes, verificou-se que, nos tumores, a junção 3-5 foi mais expressa comparativamente à junção 3-4, com exceção do CAS4065.

De uma maneira geral, tanto para os doentes com recidiva como para os doentes sem recidiva, a expressão da junção 3-4 foi maior na mucosa normal do que nos tumores dos respetivos doentes, o que está de acordo com uma menor expressão das isoformas que não expressam o exão 4 na progressão tumoral. É de notar que, nas mucosas normais dos doentes com recidiva, a expressão foi mais elevada na junção 3-5 do que na junção 3-4. Por outro lado, nas mucosas normais dos doentes que não recidivaram, observou-se o oposto. Deste modo, nos doentes que recidivaram observou-se uma maior expressão de isoformas que não expressam o exão 4 relativamente às isoformas que incluem o exão 4, enquanto nos doentes que não recidivaram se observou o inverso. Apesar da amostra reduzida, parece existir uma relação entre a maior expressão de isoformas do gene *TCF7L2* que não expressam o exão 4 relativamente às que expressam este exão e a existência de recidiva.

Se esta relação for validada numa série alargada de indivíduos, a análise comparativa da expressão das junções 3-5 e 3-4 na mucosa normal poderá vir a ser um potencial biomarcador de prognóstico.

Relativamente à expressão da junção 1-2, nos doentes sem recidiva, não se observaram diferenças significativas entre a expressão na mucosa normal e nos tumores, apesar da expressão na mucosa normal ter sido ligeiramente superior à expressão nos respetivos tumores. No entanto, nos doentes que recidivaram, com exceção do indivíduo CAS4057, a expressão da junção 1-2 foi muito menor nos tumores relativamente à mucosa normal.

Num estudo anterior, realizado pelo grupo de Gastrenterologia da UIPM, a presença de deleções na região promotora e exões proximais do gene *TCF7L2*, revelou estar significativamente associada à presença de metástases síncronas à distância ($p=0,001$) (Duarte, 2015). Deste modo, a diminuição da expressão da junção 1-2 (região de ligação à β -catenina) poderá reduzir a sinalização da β -catenina e levar ao aumento da EMT e explicar a redução de expressão nos tumores, em relação à mucosa normal, observada sobretudo nos doentes com recidiva. No entanto, há que salvaguardar que a associação observada no estudo anterior era relativa à presença de metástases síncronas, enquanto neste trabalho, os indivíduos tinham tido recidiva (metástases metacrónicas). Será necessário aumentar o número de indivíduos em estudo para se poder validar estas hipóteses. Caso isto se verifique, a redução de expressão da junção 1-2 na mucosa normal, relativamente ao tumor em indivíduos com CCR, poderia vir a constituir um fator de prognóstico, preditivo de recidiva

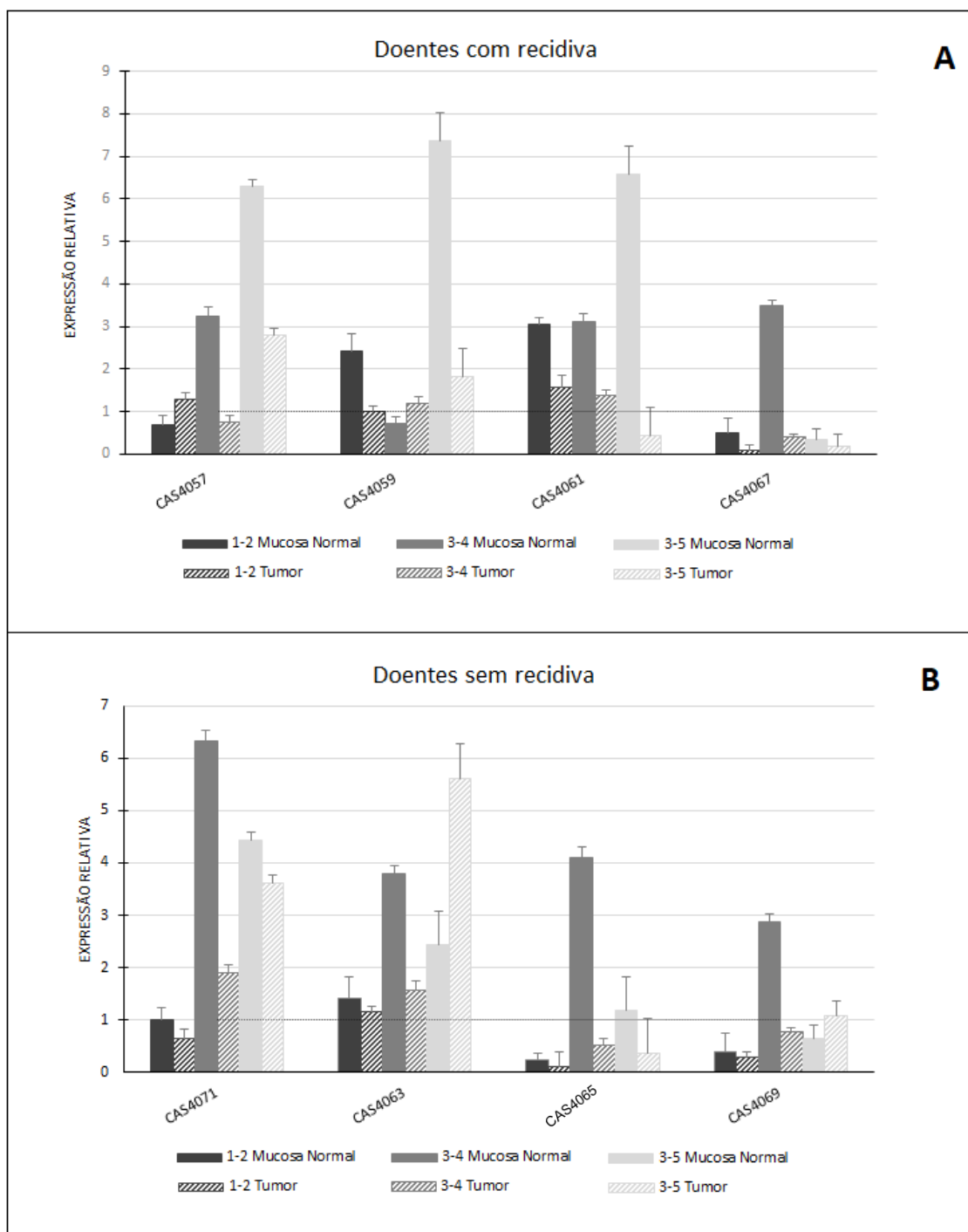


Figura 3.4 - Análise de expressão por RT-qPCR do gene *TCF7L2* utilizando os primers para as junções dos exões 1-2, 3-4, 3-5 e 7-8 em RNA extraído de sangue periférico de indivíduos com CCR estágio III (A) - que recidivaram, (B) - que não recidivaram. A expressão das várias junções de exões para cada indivíduo foi normalizada relativamente à expressão obtida em indivíduos saudáveis (linha horizontal a tracejado) e à expressão do gene de referência *SDHA*.

3.4 Potencial papel da expressão de RNAs circulares (circRNA) específicos no CCR

Na sequência de estudos prévios realizados pelo grupo de Gastrenterologia da UIPM (*vide* introdução, ponto 1.9), colocou-se a hipótese da existência de expressão de RNA circular (circRNA) na linha celular de CCR HT-29, envolvendo os exões 4 e 5 do gene *TCF7L2*. De maneira a comprovar a existência deste circRNA, realizou-se a amplificação dos exões 4 e 5 do gene *TCF7L2* utilizando 3 conjuntos de *primers*, de acordo com o descrito anteriormente (*vide* secção de métodos, ponto 2.7) [*primer forward* no exão 5 (5F) e *primer reverse* no exão 4 (4R); 2) *primer forward* com ligação específica para a junção exão5-exão4 (5-4F) e *primer reverse* no exão 4; (4R) 3) *primer forward* no exão 5 e *primer reverse* no intrão 4 (int4R)].

No geral, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram a amplificação de formas de circRNA, confirmando a expressão das mesmas em CCR e a hipótese colocada anteriormente. Foram também observadas algumas diferenças de expressão das formas de circRNA em diferentes contextos, as quais são apresentadas de seguida, no entanto será ainda necessário comparar as mesmas com a expressão de um gene controlo, como por exemplo o gene *GAPDH*, de modo a confirmar essas diferenças.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram a amplificação da junção exão5-exão4, o que confirmou a existência deste circRNA. As bandas observadas após análise do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose corresponderam a repetições dos exões 5 e 4 por esta ordem, no caso da amplificação com os *primers* 5F-4F (figura 3.5). Para além da repetição dos exões 4 e 5 identificadas, também se observaram repetições do gene *TCF7L2* que compreendiam o intrão 4, utilizando os *primers* 5F-int4R (figura 3.6), tendo havido amplificação de um fragmento que corresponde ao circRNA que compreende o exão 5, exão 4 e parte do intrão 4.

Amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene TCF7L2,

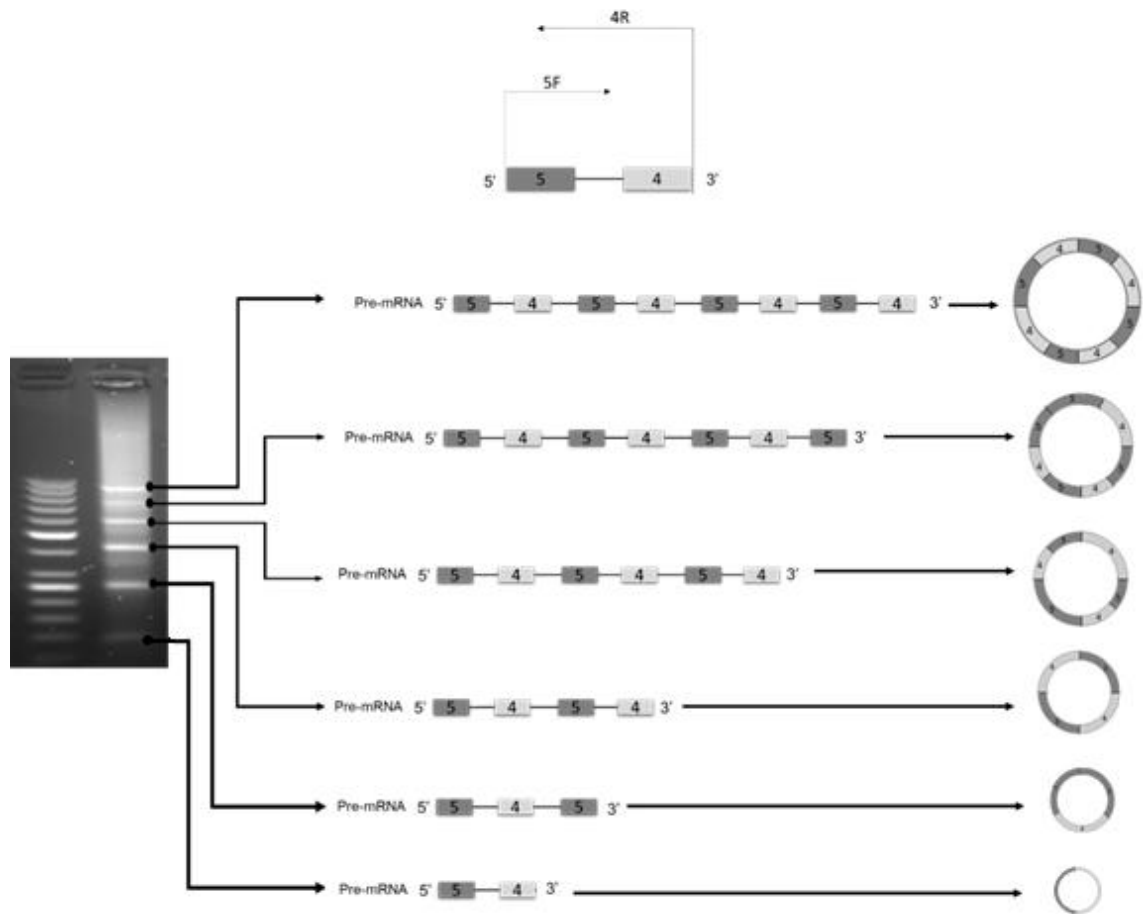


Figura 3.5 - Representação esquemática das formas de circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene TCF7L2, identificadas após amplificação, utilizando os primers 5F-4R em cDNA extraído da linha celular de CCR HT29. As sequências dos primers usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo V.

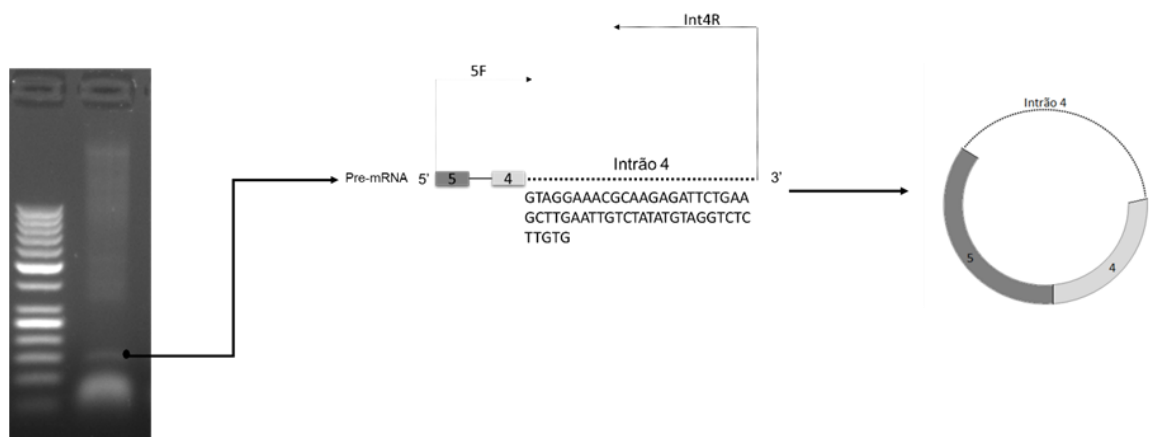


Figura 3.6 - Representação esquemática de formas de circRNA compreendendo os exões 4 e 5 e parte do intrão 4 do gene TCF7L2 após amplificação utilizando os primers 5F-Int4R em cDNA extraído da linha celular de CCR HT29. As sequências dos primers usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo IV.

Uma vez observada a amplificação destas formas de circRNA do gene *TCF7L2* na linha celular de CCR HT29, procedeu-se à amplificação das mesmas a partir do cDNA das linhas celulares de CCR (LoVo, SW480, SW48, HCT116 e SW620), da linha celular de cólon normal, da linha celular de fibroblastos e de indivíduos índex com CCR de famílias FCCTX/FCCTX-*like*, de modo a perceber se outras linhas celulares também expressavam estes circRNA (figura 3.7). Em algumas linhas de CCR (HT29, LoVo e SW480) utilizaram-se amostras de RNA extraídas de duas passagens de cultura diferentes (da mesma linha), uma correspondendo a um menor número de passagens, ou seja, a uma recolha de RNA numa passagem pouco tempo depois de a linha ter sido colocada em cultura, e uma correspondendo a um maior número de passagens, que correspondeu a uma passagem passado mais tempo desde que foi iniciada a cultura. Com isto, pretendeu-se averiguar se haveria alguma alteração no padrão ou intensidade da expressão das formas de circRNA dependendo do tempo em cultura.

Entre as várias linhas celulares, a HT29 pareceu apresentar uma maior expressão destas formas de circRNA, juntamente com a HCT116, relativamente às restantes linhas celulares (figura 3.7 A). Na linha SW480, pareceram não existir bandas correspondentes ao circRNA, na amostra respeitante ao menor número de passagens (menos tempo em cultura), observando-se expressão de circRNA na amostra respeitante a um maior número de passagens, apesar de uma intensidade baixa. É de salientar, que a linha SW620 (proveniente de metástase ganglionar da SW480) apresentou uma maior expressão de circRNA, do que a linha correspondente ao tumor primário. Estas diferenças podem ser devidas aos diferentes tempos de cultura, no primeiro caso, e ao estágio das linhas (estádio II vs III, na SW480 e SW620, respetivamente). A linha celular de fibroblastos apresentou um padrão ligeiramente diferente das restantes linhas celulares de CCR. Tendo em conta que a linha celular de cólon normal e o RNA extraído de sangue periférico de doentes com CCR, praticamente não apresentaram expressão destas formas de circRNA, ao contrário das linhas celulares tumorais, e que se observou um aumento de expressão em estádios tumorais mais avançados, a expressão deste circRNA *TCF7L2* poderá estar associado à tumorigénese colorectal e à sua progressão. Há, no entanto, que esclarecer a origem da linha de fibroblastos da região intestinal. Estes resultados, a serem validados numa série de tumores e tecido normal, poderão significar que estas formas de circRNA poderão ser promissoras como marcadores de diagnóstico e de progressão tumoral.

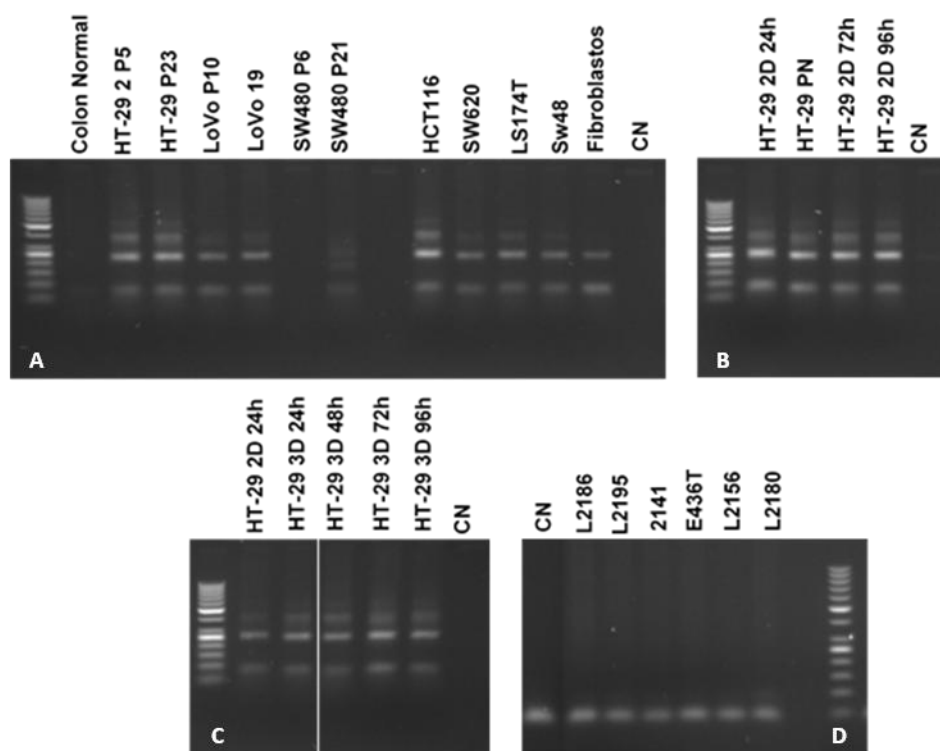


Figura 3.7 - Padrão eletroforético correspondente à análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene TCF7L2, utilizando os primers 5F-4R em cDNA. (A) - Linhas celulares de CCR, de cólon normal e de fibroblastos; (B) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 2D em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h), (C) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 3D (agregados obtidos por slow aggregation assay) em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h). (D) - sangue periférico de indivíduos index com CCR de famílias FCCTX/FCCTX-like.

As sequências dos primers usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo X.

P – Número da passagem em que se encontrava a linha celular aquando da recolha da amostra de RNA.

CN – Controlo negativo

No seguimento do presente trabalho, pretendeu-se também avaliar se, no âmbito de uma análise prévia de expressão dos genes *CD44* e *PROM1* nos modelos celulares de HT29 em cultura 2D (monocamada) e em 3D (esferóides), os fragmentos adicionais correspondentes a repetições de exões, observados sobretudo no modelo 3D, correspondiam também a circRNA. Para tal, realizou-se a amplificação de amostras de cDNA da linha celular HT29 em cultura 2D e 3D, utilizando *primers* específicos para as formas de circRNA previstas para estes genes. No entanto, tal como para o circRNA TCF7L2, avaliou-se também a expressão destes circRNA em diferentes linhas celulares de CCR, nas linhas celulares de cólon normal e de fibroblastos e em sangue periférico de doentes com CCR. Os resultados revelaram a amplificação esperada tendo em conta os *primers* utilizados, o que sugeriu a existência de circRNA, uma vez que não se sequenciaram os fragmentos obtidos (figura 3.8).

No caso do circRNA respeitante ao gene *CD44*, tendo em conta as diferentes linhas celulares (figura 3.8 A), à semelhança do observado para o circRNA TCF7L2, voltou a observar-se uma menor expressão do circRNA resultante da amplificação utilizando os *primers* 2F-1R nas linhas que correspondem a um estágio inferior (SW480- estágio II vs. SW620 – estágio III). No entanto, não pareceu observar-se a mesma relação entre a expressão observada nas linhas tumorais e a observada no cólon normal e sangue periférico. Não é possível retirar mais conclusões tendo em conta a multiplicidade de fragmentos observados e uma vez que estes não foram sequenciados.

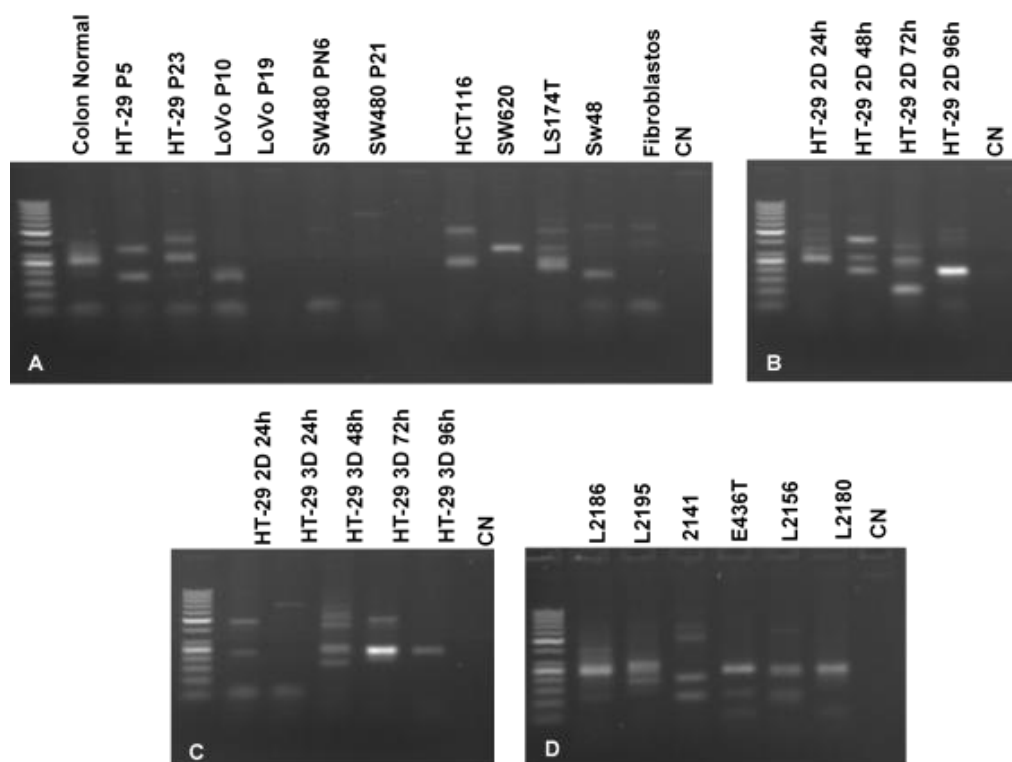


Figura 3.8 - Padrão eletroforético correspondente à análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 1 e 2 do gene *CD44* utilizando os *primers* 2F-1R. (A) - Linhas celulares de CCR, de cólon normal e de fibroblastos; (B) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 2D em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h), (C) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 3D (agregados obtidos por slow aggregation assay) em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h). (D) –Sangue periférico de indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTX-like.

As sequências dos *primers* usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo IV.

P – Número da passagem em que se encontrava a linha celular aquando a recolha da amostra de RNA.

CN – Controlo negativo.

No caso do circRNA respeitante ao gene *PROM1*, a amplificação utilizando *primers* específicos para a junção exão 5-exão 4 (5-4F- 4R) revelou a expressão do fragmento de circRNA esperado nas linhas celulares de CCR (figura 3.9), apesar de não se ter efetuado ainda a sequenciação. Na linha celular de fibroblastos, linha celular de cólon normal e no sangue periférico de indivíduos com CCR a expressão foi muito fraca ou quase ausente (decrecendo por esta ordem – fibroblastos, cólon normal, sangue periférico). Também se observou uma maior expressão na linha

celular correspondente à metástase ganglionar (SW620) derivada da linha celular SW480, o que correspondeu a uma maior expressão no estágio mais avançado (estádio III) em relação ao estágio II. Não se observaram variações significativas na expressão entre diferentes passagens e culturas 2D e 3D.

Deste modo, tal como o referido para o circRNA TCF7L2, se estes resultados forem validados numa série alargada de tumores e tecido normal, confirmando-se a expressão fraca ou ausente, sempre abaixo de um *cut-off* mínimo, em tecido normal, a expressão deste circRNA PROM1 poderia também vir a constituir um marcador de diagnóstico e de progressão tumoral. De facto, recentemente, vários circRNA têm vindo a ser identificados como potenciais marcadores no diagnóstico e no prognóstico do cancro, podendo regular a proliferação celular, apoptose, invasão e migração celulares (Zhong, *et al.*, 2018).

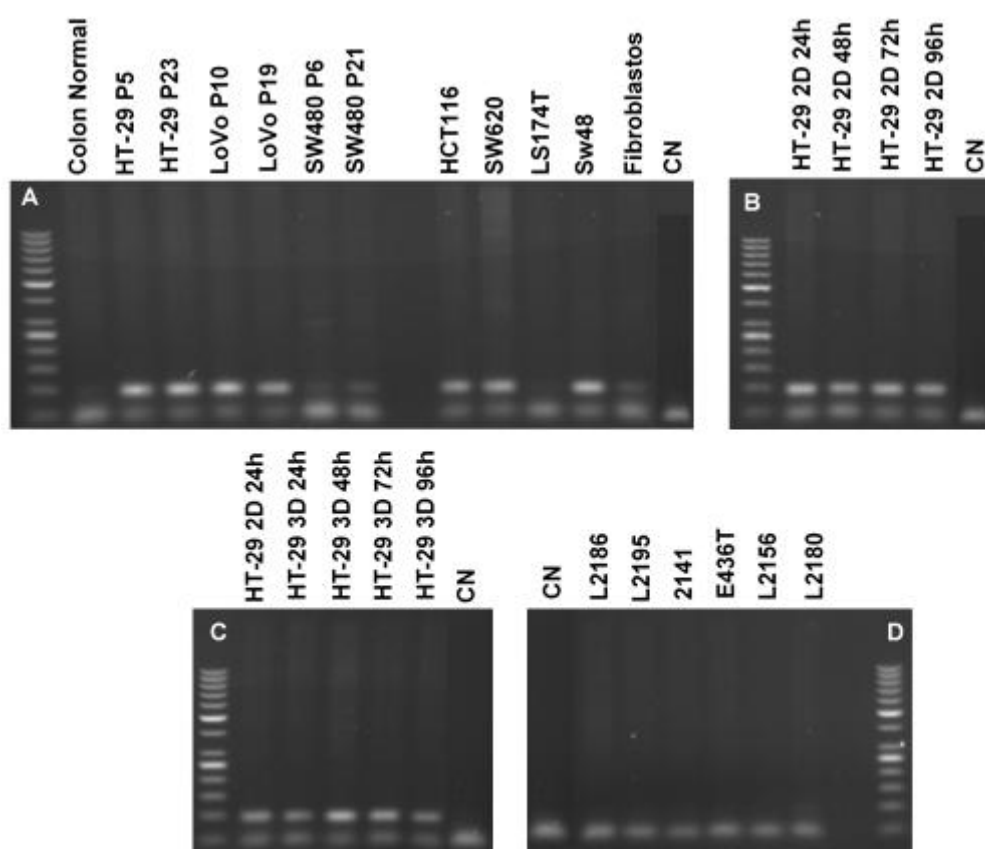


Figura 3.9 - Padrão eletroforético correspondente à análise por electroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene PROM1 utilizando os primers 5-4F e 4R. (A) - Linhas celulares de CCR, de cólon normal e de fibroblastos; (B) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 2D em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h), (C) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 3D (agregados obtidos por slow aggregation assay) em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h). (D) – Sangue periférico de indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTX-like.

As sequências dos primers usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo IV.

P – Número da passagem em que se encontrava a linha celular aquando a recolha da amostra de RNA.

CN – Controlo negativo.

A amplificação do circRNA PROM1 utilizando os *primers* 5F-4R revelou em geral uma multiplicidade de bandas após análise por eletroforese em gel de agarose (figura 3.10), o que, por não se ter ainda efetuado a sequenciação dos fragmentos de DNA correspondentes, não permite grandes conclusões. Salienta-se apenas o menor número de bandas para a linha de cólon normal, a linha de fibroblastos, o sangue periférico de indivíduos com CCR, assim como para a linha SW480, o que é consistente com os resultados obtidos com os *primers* anteriores (5-4F-4R).

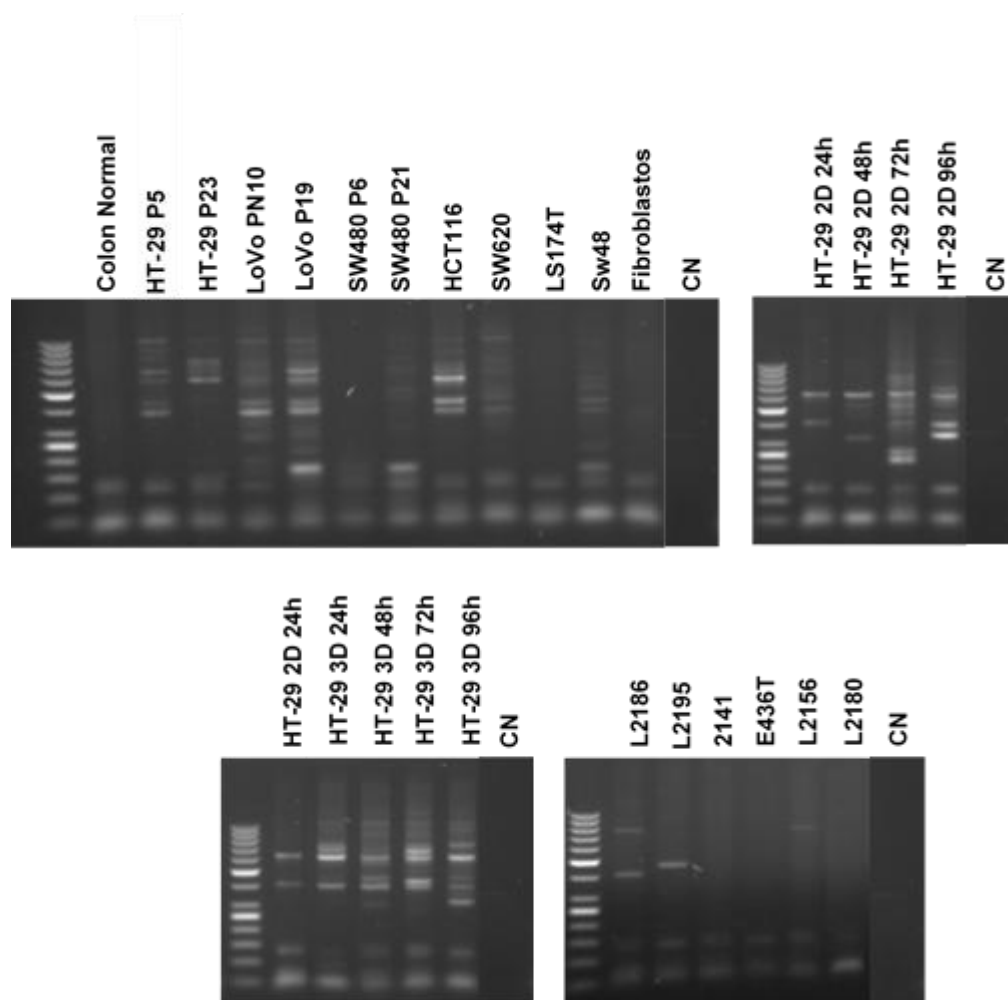


Figura 3.10 - Padrão eletroforético correspondente à análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA compreendendo os exões 4 e 5 do gene PROM1 utilizando os *primers* 5F-4R. (A) - Linhas celulares de CCR, de cólon normal e de fibroblastos; (B) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 2D em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h), (C) - Linha celular de CCR HT29 em cultura 3D (agregados obtidos por slow aggregation assay) em diferentes time points (24h, 48h, 72h e 96h). (D) – Sangue periférico de indivíduos índice de famílias FCCTX/FCCTX-like.

A sequência dos *primers* usados nesta amplificação encontram-se descritos no anexo IV.

P – Número da passagem em que se encontrava a linha celular aquando a recolha da amostra de RNA.

CN – Controlo negativo

A análise cujos resultados são apresentados na figura 3.11 pretendeu comparar a expressão dos circRNA respeitantes aos genes *TCF7L2*, *CD44* e *PROM1* em dois tipos de cultura celular da linha HT29, uma cultura 2D (em monocamada) e uma cultura 3D (em esferóides), estabelecida num estudo prévio (Pereira *et al.*, 2017). Esta última é enriquecida em células estaminais tumorais relativamente à primeira e tentou representar, de uma forma mais aproximada, o microambiente tumoral.

Relativamente ao circRNA *TCF7L2* resultante da amplificação utilizando os *primers* 5F-4R e ao circRNA *PROM1* resultante da amplificação 5-4F-4R, parece observar-se uma maior expressão no modelo 3D que se aproxima mais do modelo *in vivo*, com uma maior proporção de células estaminais tumorais, relativamente ao 2D. Este resultado parece também suportar um papel destes circRNA na tumorigénese colorectal que será importante averiguar em estudos futuros. Nos restantes casos (circRNA *CD44* utilizando os *primers* 2F-1R e circRNA *PROM1* utilizando os *primers* 5F-4R, os quais poderão ser menos específicos para a junção entre os dois exões 2F-1R e 5F-4R), a comparação não foi conclusiva devido à elevada multiplicidade de fragmentos resultantes.

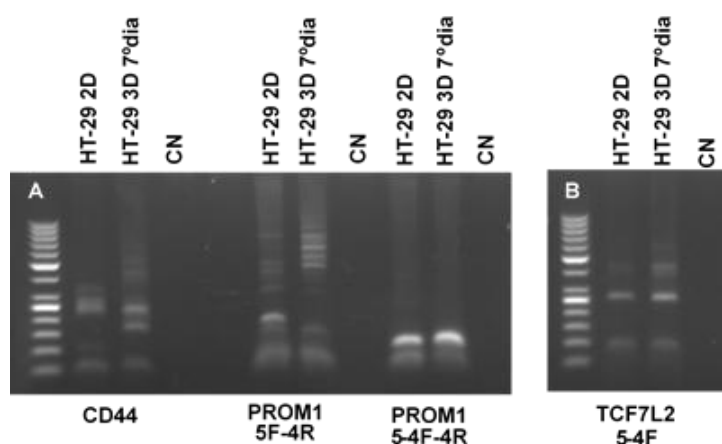


Figura 3.11 - Padrão eletroforético correspondente à análise por electroforese em gel de agarose da amplificação do circRNA dos genes (A) - *CD44* e *PROM1* (B) - *TCF7L2* para a linha celular de CCR HT29 em cultura 2D e em cultura 3D (esferóide recolhido ao 7º dia de cultura)

As sequências dos primers usados nesta amplificação encontram-se descritas no anexo IV.

CN – Controlo negativo

3.5 Estudo de terapias com capacidade anti-proliferativa em duas linhas celulares de CCR representativas de subtipos tumorais distintos

De modo a identificar compostos/fármacos com efeito anti-proliferativo promissor em dois subtipos de CCR distintos que se caracterizam por resistência à terapêutica e comportamento agressivo, realizaram-se ensaios de viabilidade celular, nas linhas celulares de CCR LoVo e SW480. A primeira é representativa de tumores MSI com elevado potencial metastático e mau prognóstico após recidiva, e a segunda de tumores MSS, com elevada sinalização TGF- β , com elevada infiltração fibroblastos no microambiente tumoral e mau prognóstico no global, como referido em mais detalhe na secção introdução, ponto 1.9).

Com a finalidade de perceber a sensibilidade e a resistência de cada linha celular a diferentes compostos, no presente estudo foram testados quatro grupos distintos de compostos: 1) fármacos citostáticos: 5-FU, irinotecano e oxaliplatina; 2) compostos moduladores das vias de sinalização c-MET e SHH; Capmatinib e GANT61; 3) Nutracêuticos: Sulfurafano e extracto de casca de laranja (OPE); 4) Inibidores de desacetilases de histonas e de DNA metiltransferases: vorinostato e azacitidina.

Os resultados obtidos para o grupo dos fármacos citostáticos, 5-FU, irinotecano e oxaliplatina (figura 3.12), demonstraram que para o 5-FU (figura 3.11 A), a LoVo revelou maior resistência do que a SW480, não tendo sido possível determinar a concentração que inibe 50% da proliferação/viabilidade celular (IC_{50}) nesta linha celular (tabela 3.6). Por outro lado, a linha LoVo demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com o irinotecano comparativamente à SW480 (figura 3.11 B). Curiosamente, as duas linhas celulares demonstraram similarmente sensíveis a este fármaco, tal como se pode observar pela proximidade dos perfis dose-resposta e valores de IC_{50} (figura 3.12 B e tabela 3.6).

Tendo em conta o grupo dos citostáticos, como seria de esperar, a linha LoVo foi a que demonstrou mais resistência, sendo esta uma linha derivada de metástases, só prova que os resultados quimioterápicos para os agentes citostáticos podem desafiar o tratamento do CCR em especial o metastático. Em paralelo a este estudo, foram realizados também ensaios de antiproliferativos para as linhas celulares de CCR HCT116, LS174T, HT29 e SW48 pelo grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG), com o intuito de se avaliar o potencial efeito anti-proliferativo dos diferentes compostos em linhas celulares representativas de diferentes subtipos de CCR, de modo a explorar estratégias terapêuticas mais personalizadas e eficazes para cada subtipo. De um modo geral, as linhas celulares responderam de maneira heterogênea aos agentes citostáticos (Anexo VIII) exibindo, à exceção da SW480 e HCT116, uma certa quimio-resistência contra o 5-FU, fármaco mais utilizado na terapêutica do CCR em regime individual ou em combinação com outros agentes Sul (Akhtar *et al.*, 2014). Estes resultados suportam o facto de que diferentes subtipos tumorais com características moleculares e celulares distintas apresentam diferentes respostas terapêuticas.

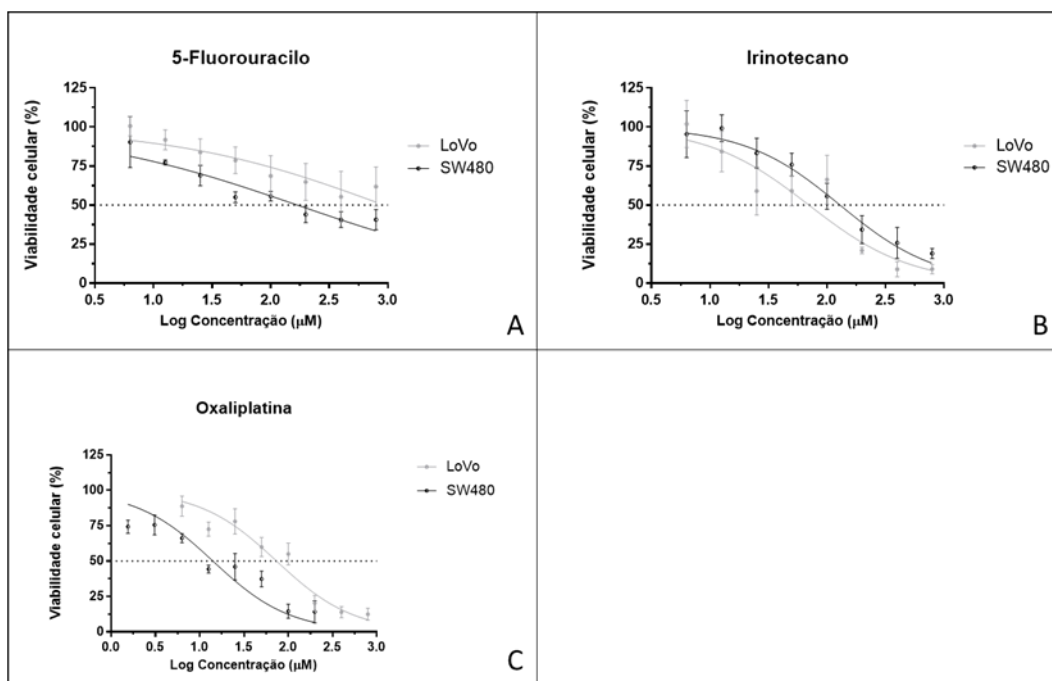


Figura 3.12 - Representação esquemática do efeito de compostos citostáticos na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480. (A) – 5-Fluorouracilo, (B) – Irinotecano, (C) – Oxaliplatina.

Tabela 3.6 - Valores de IC₅₀ para os fármacos: 5-FU - 5-Fluoruracil; Iri – Irinotecano; Cap – Capmatinib; Gant61; Aza – Azacitidina; Sulf. - Sulfurafano e OPE - Orange peel extract nas linhas celulares de CCR LoVo e SW480. - - Não foi possível determinar o valor de IC₅₀.

IC ₅₀									
	5-FU (μM)	Iri (μM)	Oxa (μM)	Cap (μM)	Gant61 (μM)	Vor. (μM)	Aza (μM)	Sulf. (μM)	OPE (mg/μL)
LoVo	-	70,2	73,88	-	191,5	3,34	-	35,52	0,2862
SW480	169,4	128,3	14,12	-	140,4	15,48	134,4	26,07	0,318

Para além dos compostos citostáticos, foi avaliado também o efeito dos moduladores das vias de sinalização c-MET e SHH, capmatinib e GANT61, respetivamente, na proliferação das linhas celulares LoVo e SW480. Como demonstrado na figura 3.13, os perfis de dose-resposta entre linhas celulares foi relativamente similar para o mesmo composto. Contudo, destaca-se a ineficácia do Capmatinib na modulação da viabilidade celular de ambas as linhas LoVo e SW480, uma vez que não provocou qualquer decréscimo significativo na mesma, não tendo sido por isso possível extrapolar valores de IC₅₀. Contrariamente, o GANT61 exerceu um efeito inibitório significativo na proliferação celular (figura 3.13), com um valor de IC₅₀ para ambas as linhas (tabela 1.6). Adicionalmente, o GANT61 exibiu também um efeito antiproliferativo similar nas restantes linhas celulares, demonstrando, assim, um efeito antiproliferativo transversal entre diferentes subtipos de CCR, de acordo com resultados do grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG) (Anexo VIII). Estes resultados apontam, portanto, para a potencialidade deste composto ser utilizado na terapia, dado o seu amplo espectro de ação entre diferentes subtipos de CCR.

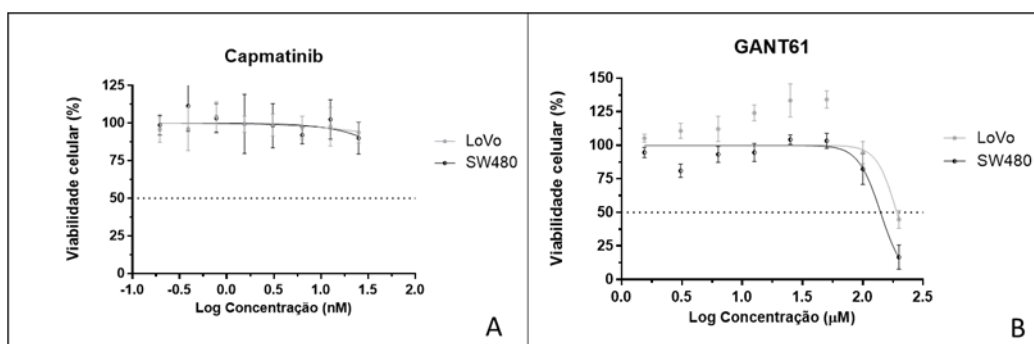


Figura 3.13 - Representação esquemática do efeito de moduladores específicos de vias de sinalização na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480. (A) – Capmatinib, (B) – Gant61.

Ambos os nutraceuticos, sulforafano e OPE exerceram um efeito anti-proliferativo significativo, não só na SW480 e LoVo (figura 3.14), como também nas restantes linhas celulares, de acordo com os resultados obtidos pelo grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG) (Anexo VIII). Deste modo, à semelhança do GANT61, estes fitoquímicos também demonstraram um efeito anti-tumoral transversal a vários subtipos de CCR, suportando a aplicação destes compostos naturais em estratégias terapêuticas que superarem a resistência das células tumorais aos fármacos convencionais, por exemplo em regimes terapêuticos combinatórios que fomentem efeitos sinérgicos na terapia do CCR, uma vez que estes compostos naturais possuem também a capacidade de modular a *stemness* e o potencial metastático das células tumorais, tal como demonstrado em trabalhos previamente desenvolvidos em colaboração com o Grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG) num modelo celular 3D da linha HT29 (Pereira, 2016; Pereira *et al.*, 2017).

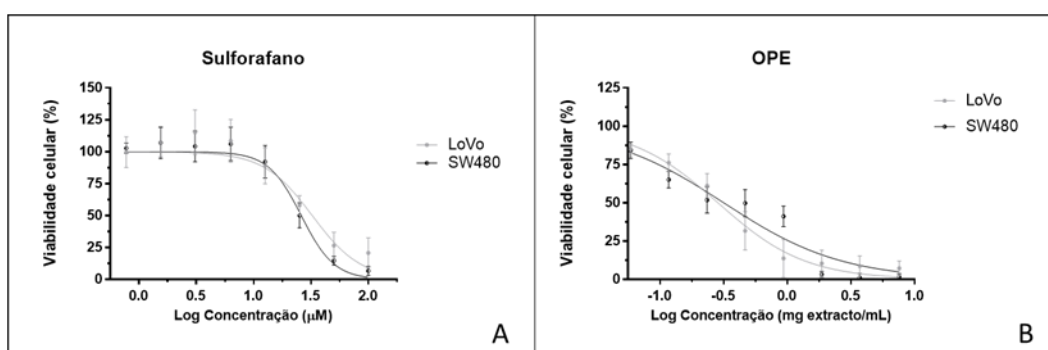


Figura 3.14 - Representação esquemática do efeito de nutraceuticos na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480. (A) – Sulforafano, (B) – OPE

Por fim, foram também testados os efeitos anti-proliferativos dos inibidores de desacetilases de histonas e de DNA metiltransferases, vorinostato e azacitidina, respetivamente, nas linhas LoVo e SW480 (figura 3.15). Curiosamente, o vorinostato demonstrou um potencial efeito anti-proliferativo mais significativo na linha LoVo do que na SW480. A tendência inversa foi observada para o

tratamento com azacitidina, no qual a linha SW480 foi a que demonstrou maior sensibilidade a este composto comparativamente à LoVo.

No geral, tendo em conta as restantes linhas analisadas pelo grupo de Gastroenterologia (UIPM-IPOLFG), o vorinostato diminuiu a proliferação em quase todos os subtipos tumorais, excetuando-se a linha LS174T e, especialmente, a HT29 que representam tumores mucinosos (MSI e MSS com mutação em *BRAF*, respetivamente) que geralmente apresentam maior quimio-resistência e pior prognóstico na clínica. Não obstante, para as mesmas doses a linha HT29 demonstrou ser a mais resistente, não só à azacitidina e ao vorinostato, como aos restantes compostos (Anexo VIII).

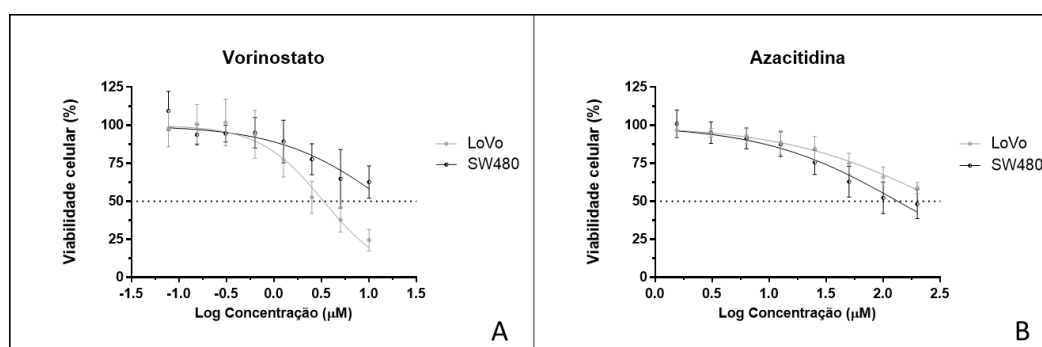


Figura 3.15 - Representação esquemática do efeito de Inibidores de histona desacetilase e de DNA metiltransferase, na viabilidade celular das linhas de CCR LoVo e SW480. (A) – Vorinostato, (B) – Azacitidina.

No geral, a SW480 uma linha MSS, epitelial, CIN e com ativação de sinalização Wnt marcada, foi a mais sensível a todos os trat

apresentaram maior resistência, de modo a avaliar de que modo o perfil de resposta poderá afetar a progressão tumoral, ao nível da capacidade migratória/metastática e da expressão de marcadores de *stemness*, EMT, ciclo celular e de vias de sinalização específicas. Assim, para a linha celular SW480 - que, de um modo geral apresentou menor resistência aos vários compostos testados (Anexo VI) - o irinotecano e o GANT61 foram selecionados como o composto para o qual esta linha celular apresentou resistência intermédia, e o 5-FU e a azacitidina foram selecionados como os compostos para os quais a SW480 demonstrou maior sensibilidade. Contrariamente, para a linha celular LoVo, o fármaco 5-FU e a azacitidina foram selecionados como os compostos para os quais foi exibida maior quimio-resistência, e o irinotecano e o GANT61 foram selecionados como os dois compostos que induziram a maior sensibilidade nesta linha celular. Na linha celular LoVo, a azacitidina, para a qual esta linha celular apresenta resistência, apenas foi testada para fins comparativos entre linhas celulares. De um modo geral, a seleção dos compostos com base na maior sensibilidade ou resistência é inversa entre linhas celulares, salientando a heterogeneidade de resposta terapêutica entre diferentes subtipos de CCR. As doses utilizadas neste estudo corresponderam a doses inferiores ao IC₅₀ obtido nos ensaios anti-proliferativos.

Para a SW480, figura 3.16 e 3.17, os fármacos que surtiram maior eficácia na inibição da migração celular das células SW480 em monocamada foram a azacitidina e o irinotecano. O irinotecano demonstrou inibir a migração celular de modo dependente da dose, tal como se pode observar pela menor percentagem de “fecho” obtida a 50 µM. Por outro lado, apesar da azacitidina ter inibido a capacidade migratória das células, este efeito não teve um acréscimo com o aumento da dose. De um modo geral, o efeito de ambos os compostos não revelou ser dependente do tempo de exposição, obtendo-se a maior eficácia às 24h de exposição ao irinotecano e à azacitidina (figura 3.17). Curiosamente, tanto o 5-FU como o GANT61 não induziram qualquer efeito na migração das células SW480, apesar desta linha celular ter revelado elevada sensibilidade a estes compostos ao nível da proliferação (figura 3.17).

Estes resultados sugerem que o irinotecano e a azacitidina aparentam ter efeitos anticancerígenos mais transversais, inibindo tanto a proliferação como a migração celular. Não obstante, apesar de os resultados terem revelado ausência de efeito do 5-FU e GANT61 a nível da migração, não se pode descartar a eficácia destes compostos ao nível da modulação de outros eventos celulares dada a sua eficácia anti-proliferativa.

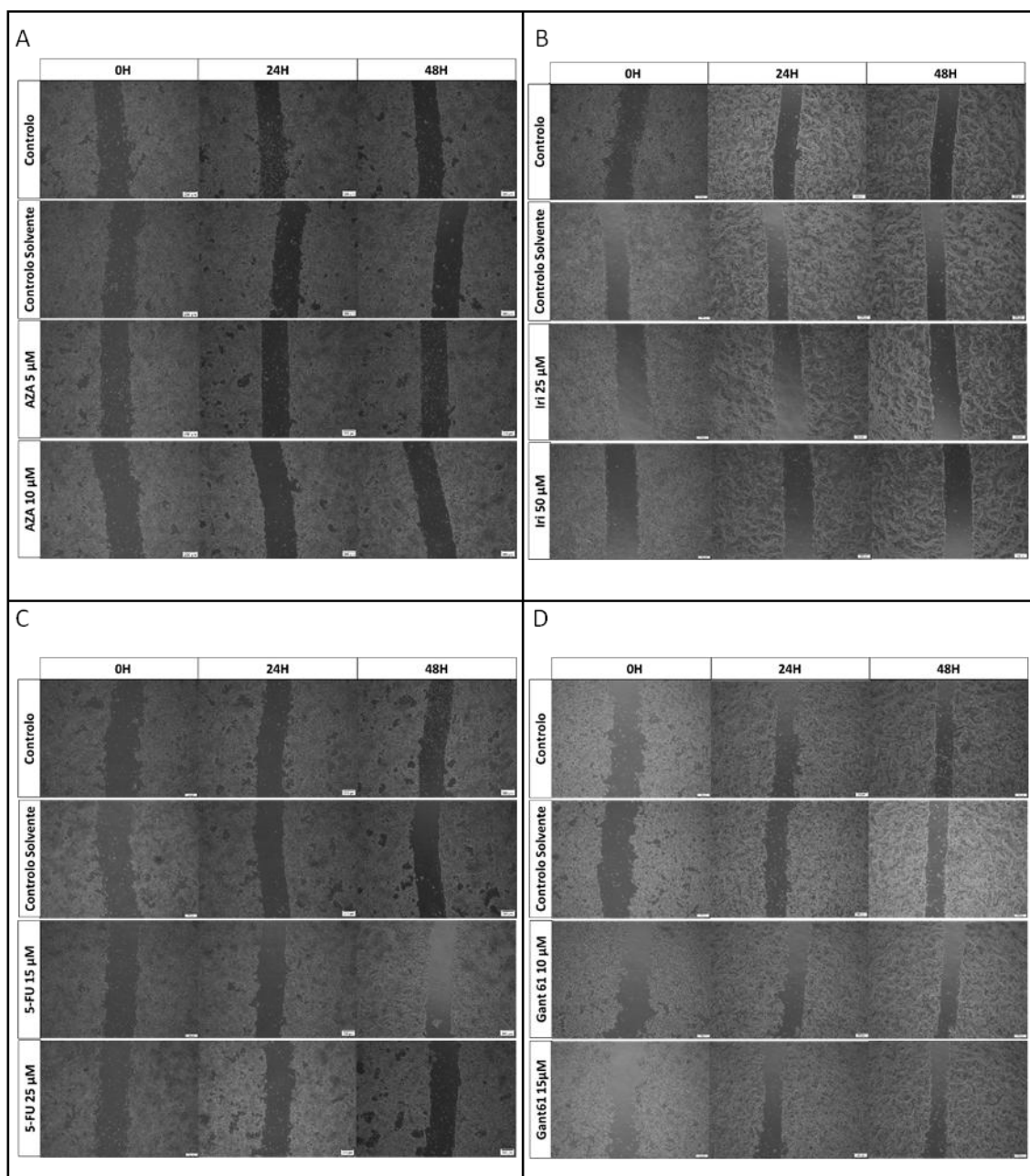


Figura 3.16 - Fotografias representativas dos resultados do ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR SW480 após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h. 0h – correspondem ao dia em que se realizou o risco. Controlo – células sem tratamento; Controlo solvente – células incubadas com a percentagem máxima de solvente utilizada no ensaio, i.e. com volume de solvente equivalente ao utilizado na maior concentração de composto. Barra de escala corresponde a 200 µm

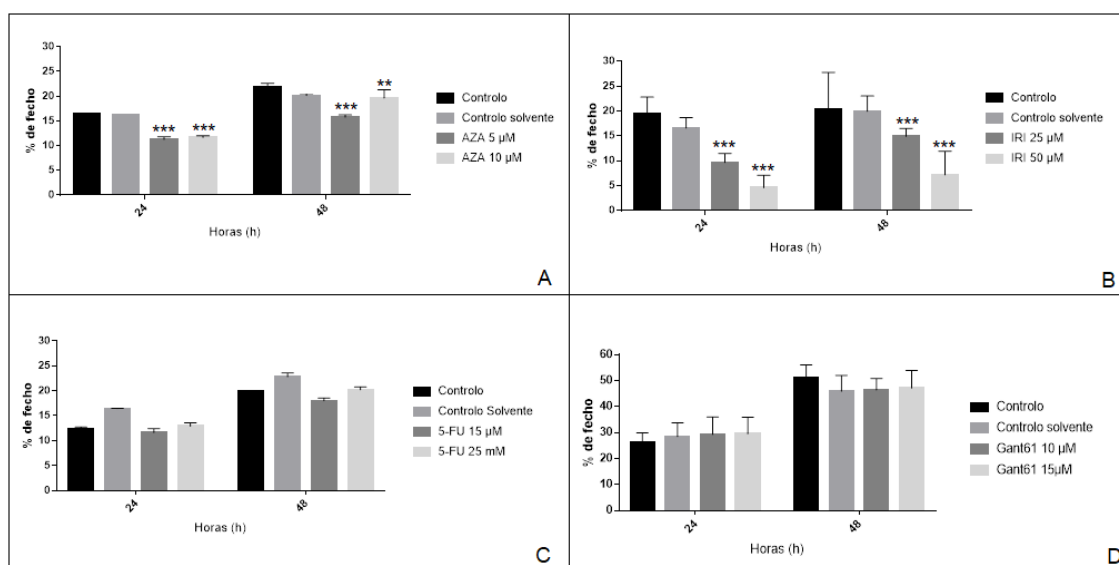


Figura 3.17 - Ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR SW480 após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h. A percentagem (%) de fecho foi calculada em relação à área inicial do risco às 0h.

Controlo – células SW480 sem tratamento; Controlo solvente – células incubadas com a percentagem máxima de solvente utilizada no ensaio, i.e. com volume de solvente equivalente ao utilizado na maior concentração de composto.

Diferenças significativas, *** $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,02$ (2way ANOVA).

Relativamente à linha celular LoVo, esta apresentou uma maior capacidade de migração/invasão comparativamente à SW480, tal como se pode observar pela migração das células “controlo” de ambas as linhas celulares ao longo do tempo (figura 3.18. e figura 3.19), o que está de acordo com a derivação da linha celular LoVo a partir de uma metástase de CCR num nódulo linfático supraclavicular (Berg *et al.*, 2017). A mesma tendência foi verificada após tratamento com os compostos selecionados para esta linha, tal como se pode observar pela percentagem de migração (% de fecho) para os mesmos fármacos, a qual foi sempre superior à obtida na linha SW480.

Na linha celular LoVo, apenas o irinotecano e o GANT61 exerceram efeito inibidor na migração, de um modo dependente da dose, tal como se pode observar a 50 μ M e 15 μ M, respetivamente, na figura 3.19. Adicionalmente, o GANT61 demonstrou efeito anti-migratório de um modo dependente do tempo, observado apenas às 48h após tratamento, contrariamente ao irinotecano que demonstrou ser mais eficaz logo às 24h após tratamento. Contrariamente, a azacitidina e o 5-FU não exerceram qualquer efeito anti-migratório na linha celular LoVo (figura 3.18). Estes resultados sugerem, portanto, em concordância com os resultados dos ensaios anti-proliferativos, que o irinotecano e o GANT61 possuem efeitos anticancerígenos mais transversais (a nível anti-proliferativo e anti-migratório), comparativamente ao 5-FU e a azacitidina.

Estes resultados sugerem, assim, que subtipos de CCR representados pela linha celular SW480, i.e. CIN, MSS, com mutação nos genes *APC*, *KRAS* e *TP53*, amplificação do oncogene *MYC*, fenótipo CIMP-, ativação da sinalização Wnt e PI3K/AKT e inibição da via EGFR (Berg *et al.*, 2017), poderão ter uma melhor resposta terapêutica, em termos de inibição da proliferação conjugada

com a diminuição do potencial migratório, após tratamento com irinotecano e azacitidina. Os subtipos de CCR representados pela linha celular LoVo, i.e MSI, com mutação nos genes *APC* e *KRAS*, fenótipo CIMP-, assinatura molecular típica de EMT (Berg *et al.*, 2017) e com elevado potencial metastático, poderão potencialmente responder melhor a regimes terapêuticos baseados em irinotecano e GANT61. Resultados obtidos pelo Grupo de Gastreenterologia da UIPM demonstraram também a eficácia destes dois últimos compostos na inibição do potencial migratório em células da linha HT29 (representativa de tumores mucinosos, MSS, com mutações no gene *BRAF*, fenótipo CIMP+, relacionados a um mau prognóstico) (Anexo VIII, figura VIII.1). Destaca-se, portanto, o efeito terapêutico mais transversal do irinotecano entre diferentes subtipos, o que suporta a sua aplicação na terapêutica do CCR possivelmente em combinação com outros fármacos/compostos.

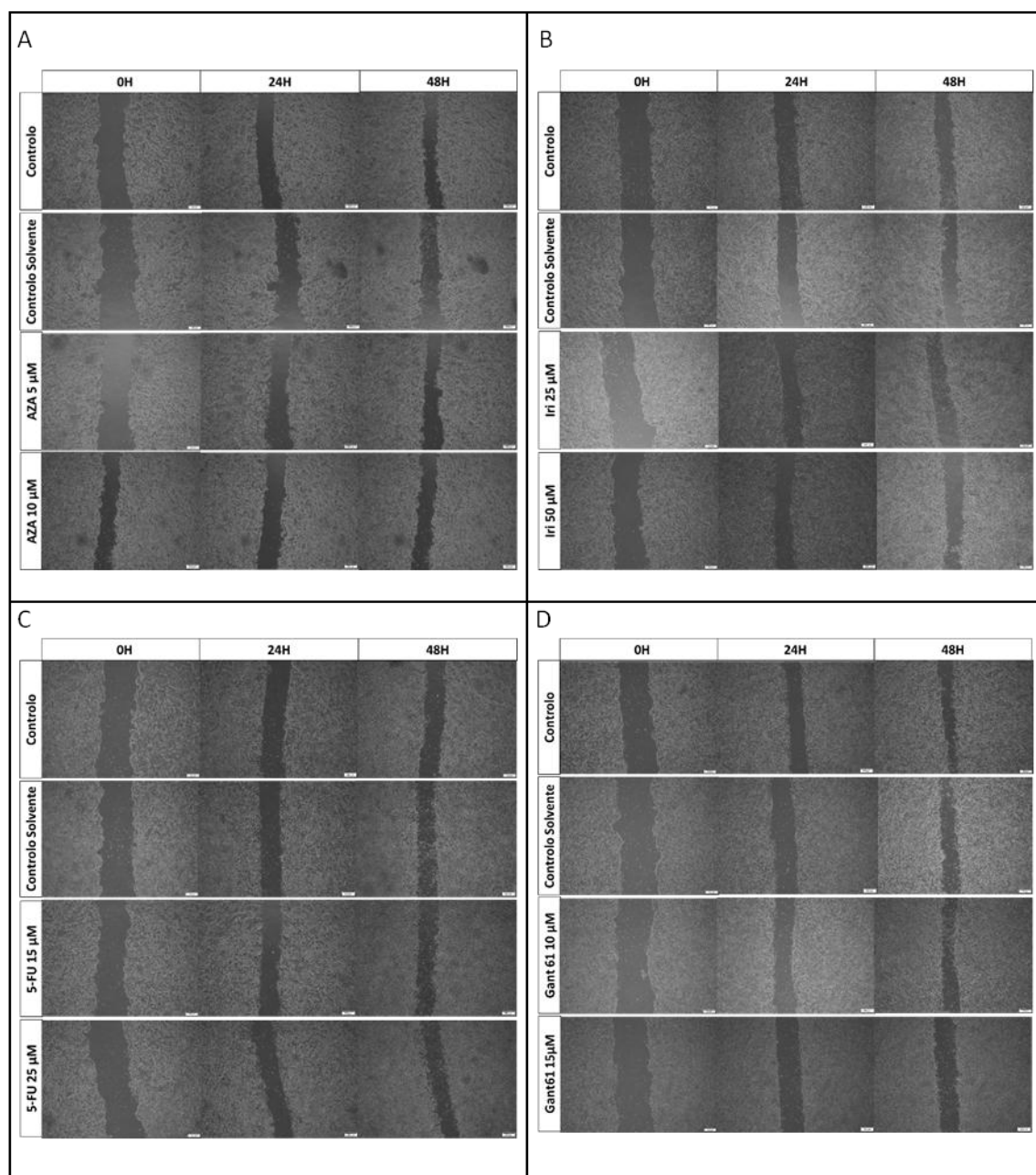


Figura 3.18 - Fotografias representativas dos resultados do ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR LoVo após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h. 0h – correspondem ao dia em que se realizou o risco. Controlo – células sem tratamento; Controlo solvente – células incubadas com a percentagem máxima de solvente utilizada no ensaio, i.e. com volume de solvente equivalente ao utilizado na maior concentração de composto. Barra de escala corresponde a 200 μm

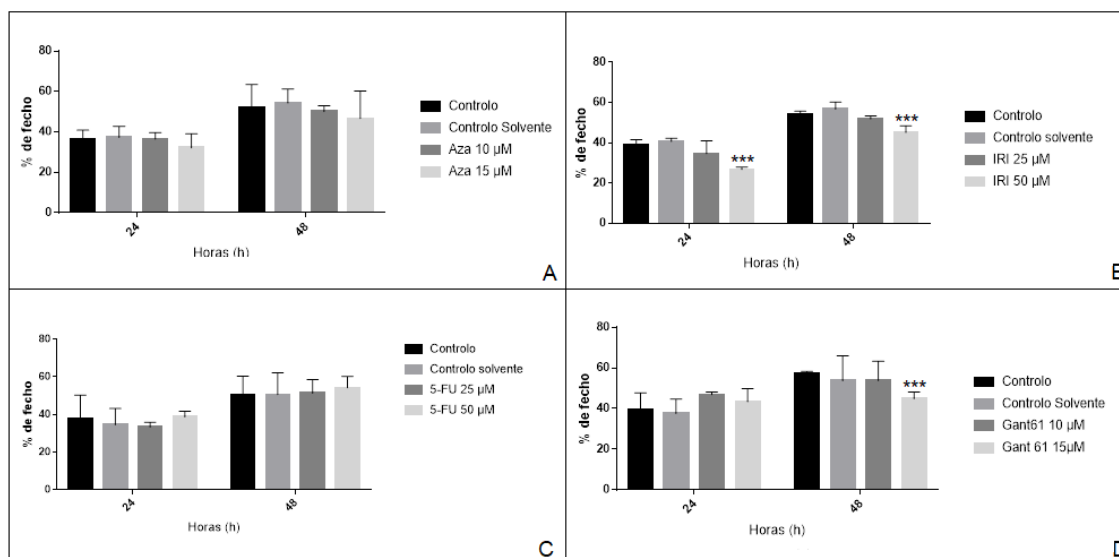


Figura 3.19 - Ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR LoVo após tratamento com (A) – Azacitidina, (B) – Irinotecano, (C) – 5-FU e (D) – GANT61, durante 24h e 48h. Para cada condição, a percentagem (%) de fecho foi calculada em relação à área inicial do risco às 0h.

Controlo – células sem tratamento.

Controlo solvente – células incubadas com a percentagem máxima de solvente utilizada no ensaio, i.e. com volume de solvente equivalente ao utilizado na maior concentração de composto.

Diferenças significativas, *** $p \leq 0,0001$ (2way ANOVA test).

3.7 Análise da expressão de marcadores envolvidos na tumorigénese e progressão tumoral do CCR

O efeito de diferentes compostos/fármacos na expressão de diferentes marcadores envolvidos na tumorigénese e progressão tumoral foi avaliado nas linhas celulares de CCR LoVo e SW480 por RT-qPCR com o objetivo de se avaliar o seu potencial efeito anti-tumoral e aplicação na terapêutica de diferentes subtipos de CCR e diferentes estádios.

À semelhança dos ensaios de migração, para a análise da expressão de determinados marcadores envolvidos na progressão tumoral foram selecionados dois compostos para os quais as linhas celulares SW480 e LoVo apresentaram moderada ou elevada sensibilidade (5-FU e azacitidina para a SW480 e oxaliplatina e irinotecano para a LoVo) e um composto para o qual apresentaram maior quimio-resistência (irinotecano e 5-FU, respetivamente), com base no efeito antiproliferativo. No caso da LoVo, o GANT61 foi também incluído no painel de compostos atendendo ao seu promissor efeito anti-migratório nesta linha celular. De salientar que as concentrações utilizadas para estes ensaios corresponderam aos valores de IC_{50} obtidos nos ensaios anti-proliferativos; nos casos em que não foi possível determinar com exatidão o valor de IC_{50} , devido a um baixo efeito antiproliferativo do composto testado ou resistência por parte da linha celular, foi utilizada a maior dose testada nos ensaios antiproliferativos (ver secção de *Materiais e Métodos*).

Para avaliação do potencial efeito anti-tumoral dos compostos na modulação da expressão de marcadores envolvidos na progressão do CCR, foram selecionados genes envolvidos na proliferação e ciclo celular (*CDKN1A* e *CCNA2*), no carácter estaminal (*stemness*) (*LGR5* e *PROM1*),

na EMT (*CDH1*, *VIM*, *SNAIL*, *ZEB1*) e nas vias de sinalização SHH (*GLI1*, *PTCH1* e *VAX2*) e TGF- β (*TGF- β 1*).

O gene *CDKN1A* codifica para a proteína p21 envolvida no crescimento, proliferação e diferenciação celular, bem como na reparação de danos no DNA. Esta proteína induz a paragem do ciclo celular, participando, assim, na inibição da progressão das células tumorais. No entanto, este gene tem vindo a ser descrito como frequentemente alterado nas células tumorais (Lin *et al.*, 2017). O gene *CCNA2* codifica para a proteína Ciclina A2 pertencente à família das ciclinas altamente conservada. A Ciclina A2 é expressa em quase todos os tecidos do corpo humano e desempenha um papel crucial no controlo das transições de fase do ciclo celular, sendo essencial nas células embrionárias e hematopoéticas. Vários estudos apontam para uma sobre-expressão deste gene em vários tipos de cancro (Gao *et al.*, 2014).

Como referido anteriormente, é importante analisar genes envolvidos na *stemness*, conhecida como a capacidade das células se auto-renovarem combinada com a capacidade de uma célula perpetuar a sua linhagem e de dar origem a células diferenciadas. O gene *LGR5* codifica para uma proteína pertencente à família de proteínas acopladas à proteína G, sendo um dos genes alvo da via de sinalização Wnt/ β -Catenina. A expressão deste gene tem sido descrita nas células estaminais adultas de diversos tecidos, como o tracto intestinal e folículos pilosos. Vários estudos têm apontado para a sobre-expressão de *LGR5* em tumores, principalmente no CCR (Cao *et al.*, 2017). Similarmente, o gene *PROM1* codifica para a proteína transmembranar Prolin-1 (CD133) expressa nas células estaminais adultas, sendo frequentemente sobre-expresso em diversos tipos de cancro.

A EMT é um processo celular através do qual as células epiteliais perdem a capacidade de adesão celular adquirindo fenótipo mesenquimal e, consequentemente, propriedades invasivas/migratórias que facilitam a sua metastização para outros locais-alvo. O gene *CDH1* codifica para a proteína E-caderina envolvida nas ligações de adesão célula-a-célula. Mutações neste gene encontram-se correlacionadas com vários tipos de cancro, nomeadamente mutações que levam à perda de função, o que contribui para o aumento da proliferação, capacidade de invasão e metastização. Geralmente, o gene *VIM* encontra-se aberrantemente metilado em carcinomas do colon e do reto em estado avançado estando, por isso, fortemente relacionado com o CCR. Nas células epiteliais do cólon normal, este gene encontra-se transcricionalmente inativo com um nível de metilação das ilhas CpG muito baixo junto ao primeiro exão, no entanto, esta região em tumores primários do cólon, encontra-se altamente metilada (Jung *et al.*, 2011). Muitos fatores de transcrição estão envolvidos na inibição da E-caderina, incluindo as proteínas Snail e ZEB1. *SNAIL* atua como um inibidor da E-caderina e tem um papel fundamental na EMT, tendo a sua sobre-expressão sido encontrada em variados tipos de cancro (Wu e Zhou, 2010). O ativador da EMT, *ZEB1*, tem demonstrado ser importante no processo de tumorigénese e metastização, através da ativação combinada da mobilidade celular e propriedades estaminais (Krebs *et al.*, 2017).

A desregulação da via de sinalização SHH tem sido associada ao desenvolvimento de cancro. *GLI1* codifica para um fator de transcrição que faz parte da via de sinalização SHH canónica e não canónica, desempenhando maioritariamente a função de ativador de genes-alvo associados à regulação da diferenciação, proliferação e sobrevivência (Mastrangelo e Milani 2018; Skoda *et al.*,

2017). *PTCH1*, codifica para o recetor principal da via SHH que reprime a transcrição de genes das famílias TGF- β e Wnt (Wang *et al.*, 2013). O gene *VAX2* codifica para uma proteína associada à regulação do desenvolvimento e morfogénese em vertebrados, principalmente ao nível do desenvolvimento do cérebro e olhos.

O fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) é uma citocina multifuncional pertencente a uma superfamília de fatores de crescimento que inclui quatro isoformas diferentes (TGF- β 1, 2, 3 e 4) e que participa ao nível da supressão tumoral. Porém, as células tumorais podem subverter a sinalização TGF- β em prol da progressão tumoral conduzindo, assim, à ativação de diferentes substratos e consequente indução da transcrição de diversos genes-alvo envolvidos na diferenciação, quimiotaxia e proliferação (Massagué, 2008).

Na linha celular LoVo o gene *CDKN1A* encontrou-se significativamente sobre-expresso após tratamento com todos os compostos selecionados (figura 3.20). Contrariamente, o gene *CCNA2* encontra-se sub-expresso em todos os tratamentos. Deste modo, estes resultados apontam para o potencial efeito dos compostos em estudo na indução da paragem do ciclo celular, corroborando o seu efeito anticancerígeno ao nível da diminuição da taxa de crescimento das células cancerígenas, em concordância com resultados anteriores obtidos nos ensaios anti-proliferativos.

Apesar dos compostos testados induzirem um efeito transversal ao nível dos marcadores do ciclo celular, o mesmo não foi verificado para os marcadores de *stemness*. Tal como demonstrado na figura 3.20, o tratamento da linha celular LoVo com os três fármacos citostáticos (convencionalmente usados na terapêutica do CCR), diminuiu significativamente a expressão dos genes *LGR5* e *PROM1*, salientando-se a maior eficácia do irinotecano e da oxaliplatina na inibição da expressão destes marcadores. Contrariamente, o tratamento com GANT61 não induziu efeito significativo na modulação da expressão destes marcadores de *stemness*. Todavia, não se poderá descartar a hipótese de que este último composto possa exercer efeitos mais significativos após tratamento durante um maior tempo de exposição.

Relativamente à modulação da EMT, os compostos testados não aparentam modular a adesão celular via E-caderina, tal como demonstrado pela ausência de efeito significativo na expressão de *CDH1* (figura 3.20). Note-se que o 5-FU aparenta diminuir ligeiramente a adesão celular, sendo portanto plausível considerar ensaios adicionais, quiçá com outro marcador epitelial em adição ao *CDH1*, para confirmação deste resultado. A mesma tendência foi observada para a expressão do gene *VIM*, para o qual a maioria dos compostos não influenciou significativamente a expressão deste marcador mesenquimal. Como excepção, destaca-se a oxaliplatina que induziu a sobreexpressão deste marcador, bem como dos marcadores mesenquimais *SNAIL* e *ZEB1*, o que poderá sugerir uma possível resistência à terapêutica com este fármaco em subtipos de CCR representados pela linha celular LoVo. Estes resultados suscitam a hipótese de que regimes terapêuticos baseados em oxaliplatina possam eventualmente erradicar a fração de células mais sensíveis a este fármaco, via efeito antiproliferativo e diminuição do carácter estaminal, podendo porém seleccionar as células tumorais mais resistentes com características mesenquimais que possam estar eventualmente em circulação (sob a forma de pequenos agregados). Em relação ao repressor da expressão de *CDH1* (E-caderina), *SNAIL*, apenas o 5-FU aparenta exercer uma

diminuição significativa na expressão deste marcador. Contudo, atendendo à ambiguidade no resultado na expressão do marcador epitelial *CDH1* (apesar da diminuição na expressão do seu repressor *SNAIL*) em conjunção com o aumento na expressão de *ZEB1*, e com a ausência ou menor efeito anti-migratório e anti-proliferativo, respectivamente, do 5-FU nesta linha celular, poder-se-á sugerir que este fármaco convencional, no qual a terapêutica do CCR é fortemente apoiada, poderá, à semelhança da oxaliplatina, promover a seleção de células mais mesenquimais/resistentes que podem incitar a recidiva da doença. Considerando os resultados dos vários ensaios celulares, de um modo geral, à exceção do irinotecano que não influenciou significativamente a expressão dos marcadores de EMT, os restantes fármacos convencionais – 5-FU e oxaliplatina - não demonstraram efeito anti-tumoral de largo espectro (atuando em termos de proliferação, *stemness*, migração e EMT), podendo suscitar assim efeitos indesejados, nomeadamente a metastização da doença.

Relativamente à via de sinalização SHH, de um modo geral, todos os compostos pareceram induzir a diminuição da expressão do *GLI1*, à exceção do irinotecano que exibiu efeito oposto. A mesma tendência foi observada para o gene *PTCH1*, relativamente à qual, o único fármaco que aparentemente exerceu o efeito desejado foi o irinotecano ao aumentar a expressão deste gene supressor de tumor. Similarmente, em relação à expressão do gene *VAX2*, o irinotecano foi o único composto que aparentemente exerceu uma diminuição significativa na expressão deste marcador. Apesar das pequenas diferenças, a oxaliplatina aumentou ligeiramente a expressão de *VAX2* e o 5-FU e GANT61 não exerceram quase nenhuma influência na expressão deste gene, apesar destes dois últimos compostos induzirem a diminuição de *PTCH1*. Apesar do GANT61 ser um conhecido modulador da via SHH, tendo Gli1 como alvo direto (Mazumdar *et al.*, 2011), no subtipo de CCR representado pela LoVo este composto não teve a capacidade de modular esta via de sinalização. Contudo, não se deve descartar o potencial efeito deste composto neste contexto celular, uma vez que a inibição exercida pelo GANT61 ocorre ao nível da proteína e, portanto, é possível que a expressão do gene possa não traduzir esse efeito ou que os efeitos anti-tumorais deste composto possam ocorrer mais tardiamente. Assim, ensaios considerando um maior tempo de exposição para avaliação da expressão de genes-alvo da via SHH deverão ser considerados em futuros ensaios.

Não obstante, os resultados sugerem que o irinotecano possa ser um modulador desta via de sinalização, considerando os resultados da expressão de *PTCH1* e *VAX2*, mas serão necessários ensaios adicionais para avaliar o seu efeito na expressão de *GLI1* após um maior tempo de exposição.

De maneira geral, à exceção do irinotecano, todos os compostos parecem ter diminuído a expressão de TGF- β 1, parecendo modular uma das vias de sinalização que participa ativamente na invasão e metastização das células tumorais (Massagué, 2008). No entanto, destaca-se o GANT61 com um efeito anti-tumoral mais significativo na modulação da expressão deste marcador, o que está de acordo com a sua capacidade de inibição da proliferação, migração e potencial metastático (figura 3.20).

Em suma, para subtipos de CCR representados pela LoVo (MSI, com elevado potencial metastático) o irinotecano demonstrou ser o composto mais promissor, seguido pelo GANT61. Porém, os efeitos anti-tumorais deste último poderão futuramente ser complementados através de

terapia combinatória em sinergia com outros compostos, nomeadamente com nutracêuticos com conhecida atividade anti-tumoral, como compostos fenólicos derivados de casca de laranja (Silva *et al.*, 2018) e isotiocianatos derivados de vegetais crucíferos (Pocasap e Weerapreeyakul, 2016).

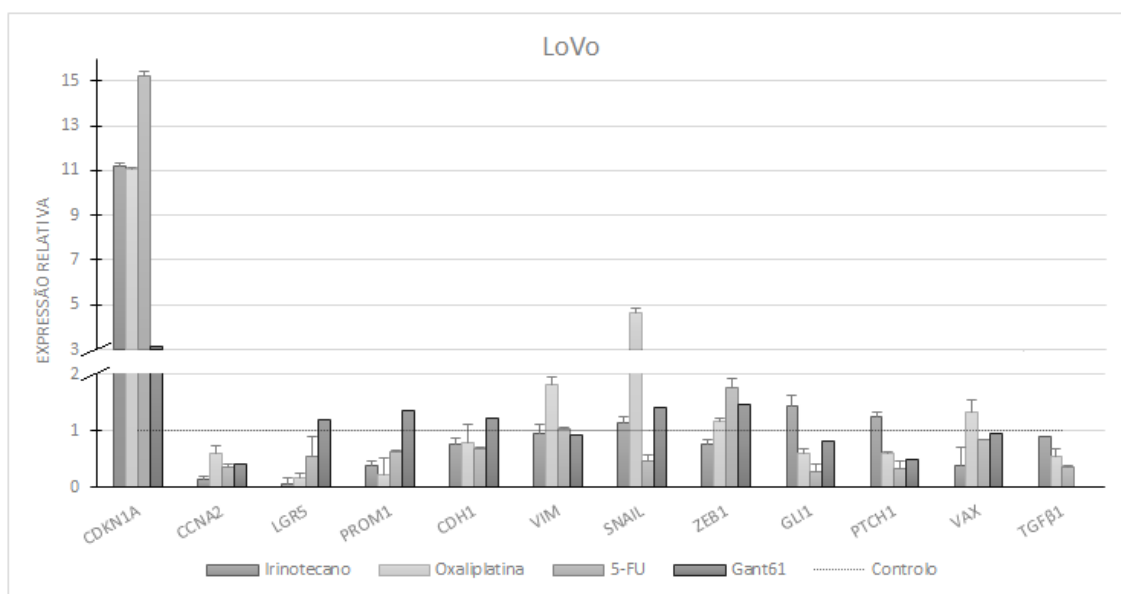


Figura 3.20 - Análise de expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas no ciclo celular (*CDKN1A*, *CCNA2*), carácter estaminal (*LGR5*, *PROM1*), EMT (*CDH1*, *VIM*, *SNAIL*, *ZEB1*), vias de sinalização SHH (*GLI1*, *PTCH1*, *VAX*) e TGF- β (*TGFβ1*) por RT-qPCR após tratamento da linha celular LoVo com fármacos citoestáticos (Irinotecano, Oxaliplatina e 5-FU) e com o inibidor da via de sinalização SHH (GANT61).

Controlo – cDNA da linha celular LoVo sem nenhum tratamento.

Relativamente à linha celular SW480, os compostos testados (azacitidina, 5-FU e irinotecano) também modularam a expressão de diversos marcadores de proliferação, *stemness*, EMT e vias de sinalização específicas (figura 3.21).

Em relação ao Irinotecano, este foi o único fármaco que pareceu exercer o efeito desejado, ao aumentar a expressão do marcador do ciclo celular *CDK1NA*. Já o 5-FU pareceu, pelo contrário, diminuir a expressão deste gene e assim diminuir a paragem do ciclo celular.

Relativamente aos marcadores de *stemness* *LGR5* e *PROM1*, a azacitidina foi o único composto que demonstrou maior eficácia na diminuição da expressão de ambos os genes. Também o irinotecano diminuiu significativamente a expressão de *LGR5*, não tendo alterado contudo a expressão de *PROM1*. Contrariamente, o 5-FU diminuiu a expressão de *PROM1* e não influenciou a expressão de *LGR5*. Estes resultados sugerem que a azacitidina é o composto com maior potencial para contornar a *stemness* das células tumorais de subtipos de CCR representados pela SW480.

Por outro lado, a azacitidina também demonstrou um efeito mais promissor na modulação da EMT, o que suporta o seu efeito anti-migratório observado no ensaio *wound-healing* (figura 3.21). Apesar de não afetar a expressão de *CDH1*, este composto foi o único que induziu uma diminuição da expressão dos marcadores mesenquimais *VIM*, *SNAIL* e *ZEB1* nas células SW480. Curiosamente,

os fármacos citostáticos apresentaram, de uma forma geral, um efeito contraditório na EMT, observado pela diminuição da expressão de *VIM* e *SNAIL* em paralelo com a expressão de *CDH1* após tratamento com 5-FU, e pelo aumento da expressão de *CDH1* em paralelo com elevada expressão de *VIM* e *SNAIL* após exposição ao irinotecano. Atendendo ao efeito anti-migratório observado após exposição ao irinotecano a uma dose inferior ao IC₅₀ (figura 3.21), é possível considerar que a utilização de uma menor dose de irinotecano possa exercer efeito anti-tumoral sem promover a sobreexpressão de marcadores mesenquimais. Neste contexto, ensaios futuros de avaliação da expressão deverão considerar o decréscimo na dosagem deste citostático, bem como a avaliação de outros marcadores de EMT e migração (e.g. *MMP7* e *MMP9*) (Gilles *et al.*, 2005).

Assim, considerando os resultados do efeito de elevadas doses do 5-FU e irinotecano, na modulação da EMT, deve-se considerar a hipótese do tratamento com estes fármacos convencionais poder promover a recidiva da doença, uma vez que estádios intermédios de EMT podem promover a quimioresistência e o potencial de iniciação tumoral, por exemplo ao promover a formação de pequenos agregados de células tumorais que poderão extravasar para a corrente sanguínea e colonizar outros locais (Onuchic e Levine 2015).

Contudo, apesar do seu efeito promissor na modelação da *stemness* e EMT, a azacitidina não exerceu um efeito promissor na modelação dos marcadores da via SHH, promovendo inclusive a sobre-expressão de *GLI1* em paralelo com a diminuição da expressão do gene supressor de tumor *PTCH1* (figura 3.xx), o que se poderá traduzir no aumento da sinalização da via SHH (Mastrangelo e Milani 2018; Skoda *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2013)

Considerando que durante a progressão do CCR de um estágio mais inicial para um estágio mais avançado há um decréscimo da sinalização Wnt acompanhado por um aumento da sinalização SHH (Tang *et al.*, 2008), existe a possibilidade de, em tumores que recapitem as características da SW480, um tratamento mais prolongado com azacitidina poder promover a metastização. A análise de expressão de outros marcadores da via Wnt/ β -catenina (e.g. *CTNNB1*, *TCF7L2* e *AXIN2*) poderia contribuir para esclarecer esta modelação da via SHH e Wnt/ β -catenina. Contrariamente, apesar de aumentar a expressão de *GLI1*, o irinotecano, aparenta modelar negativamente a via SHH, tal como se pode observar pelo aumento da expressão de *PTCH1* e diminuição da expressão de *VAX2*. Por outro lado, o 5-FU apenas pareceu ter o efeito desejado ao nível da modelação do marcador *VAX2*.

Relativamente à via de sinalização TGF- β , o irinotecano e a azacitidina foram os únicos fármacos que modelaram a expressão de *TGF β 1*, apesar de atuarem inversamente. O irinotecano aumentou a expressão de *TGF β 1*, suportando a hipótese de que no subtipo de tumor representado em tumores com as características da SW480 o tratamento com este fármaco pudesse associar a um fenótipo mais agressivo, em concordância com o seu efeito na indução de um estado intermédio de EMT. Curiosamente, a azacitidina induziu a diminuição da expressão de *TGF β 1*, o que está também de acordo com a sua capacidade de diminuir a expressão de marcadores mesenquimais.

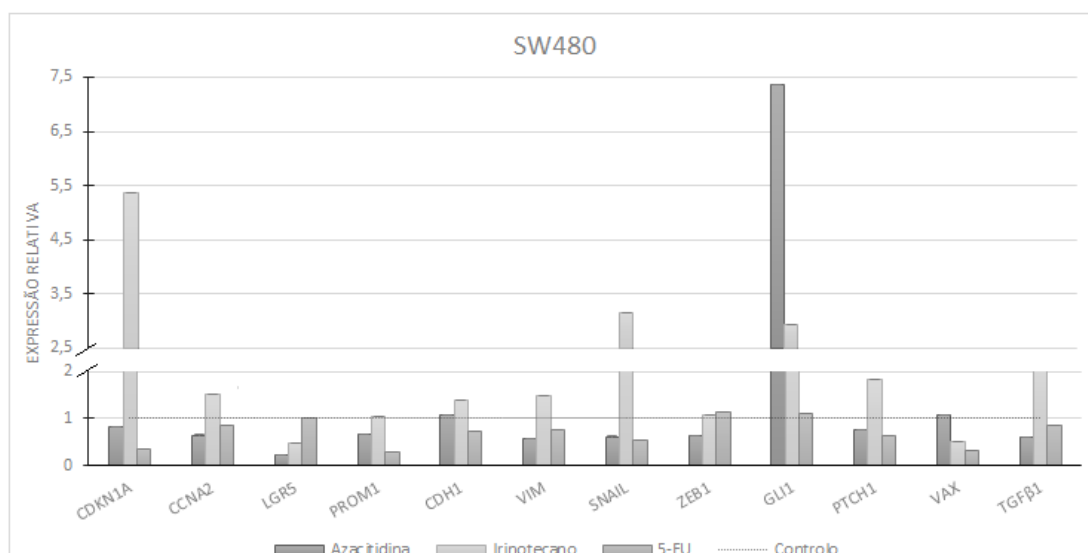


Figura 3.21 - Análise de expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas no ciclo celular (CDKN1A, CCNA2), carácter estaminal (LGR5, PROM1), EMT (CDH1 VIM, SNAIL, ZEB1), vias de sinalização SHH (GLI1, PTCH1, VAX) e TGF- β (TGF β 1) por RT-qPCR após tratamento da linha celular SW480 com fármacos citoestáticos (Irinotecano, Oxaliplatina e 5-FU) e com o inibidor da via de sinalização SHH (GANT61).

Controlo – cDNA da linha celular SW480 sem nenhum tratamento.

3.8 Novas terapias em perspectiva: contornar a citotoxicidade em células normais e potenciar os efeitos terapêuticos nas células tumorais

Paralelamente, o grupo de Gastroenterologia da UIPM realizou também ensaios de citotoxicidade na linha celular de cólon normal CCD 841 CoN, para avaliar a toxicidade das concentrações utilizadas nos ensaios de migração e dos valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios anti-proliferativos. De modo geral, as doses de 5-FU, irinotecano e azacitidina utilizadas em ambos os ensaios não exerceram efeitos citotóxicos significativos na linha de cólon normal, com viabilidades celulares entre aproximadamente 80-100% (Anexo VIII, figura VIII.2). Contrariamente, os valores de IC₅₀ para o GANT61 em ambas as linhas revelaram ser extremamente citotóxicos para as células de cólon normal (aproximadamente 0% de viabilidade celular). Apenas as doses de GANT61 utilizadas nos ensaios de migração não revelaram citotoxicidade (87-99% viabilidade celular).

Não obstante, uma maneira de contornar a citotoxicidade nas células normais e/ou a quimio-resistência das células tumorais seria a conjugação com outros compostos, de modo a obter efeito anti-tumoral igual ou superior num regime de terapia combinatória. Uma possibilidade seria conjugar os compostos mais promissores e/ou citotóxicos (como o GANT61) com nutracêuticos devido ao seu efeito anti-tumoral transversal a vários subtipos de CCR, tal como o observado para o SF e OPE em várias linhas celulares de CCR (Anexo VIII, figura VIII.4). Deste modo, seria importante realizar estudos de sinergias entre compostos de modo a explorar as combinações mais promissoras e que permitissem diminuir a dose dos fármacos e potenciar a sua ação anti-proliferativa e anti-migratória/metastática.

4 Conclusão

Sendo o cancro do cólon e do reto um dos cancros mais letais, principalmente devido à resistência às terapias e diagnóstico em estádios avançados, este estudo teve como objetivo a identificação de potenciais biomarcadores de diagnóstico e de progressão e o estudo de novas terapias na tumorigénese colorectal e na metastização, direccionadas para subtipos agressivos de CCR.

Sabe-se que, mutações associadas à via de sinalização Wnt têm vindo a ser relacionadas com o CCR, incluindo certos polimorfismos no gene *TCF7L2*. Neste estudo, tendo em conta os resultados obtidos para a frequência dos genótipos dos polimorfismos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 do gene *TCF7L2*, foi possível observar uma maior frequência de homozigotia para o alelo normal, a qual parece ser compensada por uma menor frequência de heterozigotia, no grupo de doentes CB. Foi sugerido que, a diferença na frequência destes genótipos para os polimorfismos nos doentes CB, comparativamente às frequências reportadas nas bases de dados populacionais ibérica e europeia, assim como relativamente a uma população controlo de indivíduos saudáveis portugueses populações e indivíduos com CCR esporádico, possa estar associada ao desenvolvimento de CCR associado aos CB. Desta forma, será importante comprovar esta associação, noutras séries de doentes CB e esporádicos, o que poderá permitir que a análise do genótipo para os polimorfismos rs3814570, rs10885394 e rs10885395 do gene *TCF7L2* possa vir a constituir um biomarcador de diagnóstico. Será também fundamental esclarecer a natureza molecular desta associação.

O gene *TCF7L2* está associado a um processo de *splicing* complexo, que dá origem a diferentes isoformas, que estão correlacionadas com diferentes funções fisiológicas e fisiopatológicas, e que se relacionam com o CCR. Neste estudo, não se observou nenhuma relação entre os diferentes genótipos para os polimorfismos, localizados nos intrões 4 e 5 do gene *TCF7L2*, e a expressão de isoformas sem o exão 4 em indivíduos FCCTX/FCCTX-like que preenchem os CB 4 e 5. De uma maneira geral, nas linhas celulares de CCR, também pareceu não existir correlação entre o genótipo para os polimorfismos em estudo e o estágio de cada linha. No entanto, observou-se uma possível correlação entre a expressão de isoformas, sem o exão 4, e o aumento da probabilidade de recidivar em indivíduos com CCR em estágio III. De facto, nas mucosas normais dos doentes com recidiva, a expressão foi mais elevada na junção 3-5 do que na junção 3-4. Por outro lado, nas mucosas normais dos doentes que não recidivaram, observou-se o oposto. Deste modo, a análise comparativa da expressão das junções 3-5 e 3-4 na mucosa normal, poderá vir a ser um potencial biomarcador de prognóstico, pelo que será muito importante dar continuidade a este estudo preliminar.

Verificou-se ainda uma relação entre os doentes que recidivaram e uma menor expressão da junção 1-2 nos tumores, relativamente à mucosa normal. Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo e resultados prévios obtidos pelo grupo de Gastroenterologia da UIPM, esta redução de expressão poderia vir a constituir um fator de prognóstico, preditivo de recidiva. No entanto, será necessária uma amostra maior de doentes para se poder validar esta situação.

Recentemente, cada vez mais ncRNAs têm vindo a ser associados à progressão e desenvolvimento tumoral, nomeadamente, os circRNAs têm demonstrado um papel importante na biologia do CCR. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a presença de circRNA, derivado do gene *TCF7L2*, que corresponderam a repetições dos exões 5 e 4 na linha celular de CCR HT29. Tendo em conta os resultados obtidos para as restantes amostras, formulou-se a hipótese que a expressão deste circRNA *TCF7L2* poderá estar associado à tumorigénese coloretal e à sua progressão. De facto, observou-se uma menor expressão na linha celular SW480 comparativamente à metástase ganglionar SW620, que é derivada da linha anterior, e na linha de cólon normal não foi observada expressão. Estes resultados necessitam, no entanto, de ser validados numa série de tumores e tecido normal.

De forma geral, os resultados revelaram a amplificação esperada tendo em conta os *primers* utilizados, tanto no gene *CD44* como no *PROM1*, o que sugeriu a existência de circRNA, uma vez que não se sequenciaram os fragmentos obtidos. Em ambos os casos, voltou-se a observar uma menor expressão nas linhas que correspondem a um estágio inferior comparativamente às correspondentes a um estágio superior. No entanto, não foi possível retirar mais conclusões para estes genes devido à multiplicidade de fragmentos observados e uma vez que estes não foram sequenciados.

Dada a urgência de desenvolvimento de novas terapias e de terapias mais direcionadas no CCR, neste estudo, pretendeu-se analisar a resposta das diferentes linhas celulares de CCR LoVo e SW480, a diferentes fármacos e nutracêuticos.

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo, verificou-se a ineficácia do capmatinib na modulação da viabilidade em ambas as linhas LoVo e SW480. Já para o GANT61, os resultados obtidos, neste estudo, revelaram um efeito inibitório significativo na proliferação celular em ambas as linhas, sendo que em resultados obtidos pelo grupo de Gastrenterologia da UIPM em paralelo também se verificou um efeito antiproliferativo transversal entre diferentes subtipos de CCR.

Ambos os nutracêuticos, sulforafano e OPE exerceram um efeito antiproliferativo significativo, não só na SW480 e LoVo como nas restantes linhas celulares demonstrando um efeito anti-tumoral transversal. Desta forma, suportando a aplicação destes compostos naturais em sinergia com fármacos convencionais, por exemplo em regimes na terapia do CCR.

No geral, a SW480 uma linha MSS, epitelial, CIN e com elevada ativação da sinalização WNT, foi a mais sensível a todos os tratamentos, enquanto a linha LoVo MSI, que apresenta uma assinatura molecular típica de EMT e com elevado potencial metastático, apresentou moderada a elevada resistência a vários compostos. Estes resultados suportam portanto a heterogeneidade na resposta terapêutica dos casos de CCR e a ausência de efeito anti-tumoral transversal nos fármacos convencionalmente aplicados na terapia, dificultando assim a obtenção de um bom prognóstico.

Os resultados de migração celular, obtidos neste estudo, sugerem, que subtipos de CCR representados pela linha celular SW480 poderão ter uma melhor resposta terapêutica, em termos de inibição da proliferação conjugada com a diminuição do potencial migratório, após tratamento com irinotecano e azacitidina. Os subtipos de CCR representados pela linha celular LoVo poderão potencialmente responder melhor a regimes terapêuticos baseados em irinotecano e GANT61. Tendo

em conta os resultados prévios, obtidos pelo grupo de Gastrenterologia da UIPM, onde se observou, também, uma inibição do potencial migratório em células da linha HT29 (i.e. mucinosa e MSS) após tratamento com irinotecano, destaca-se, o efeito terapêutico mais transversal deste fármaco. A ação transversal do irinotecano nos diferentes subtipos suporta a sua aplicação na terapêutica do CCR possivelmente em combinação com outros fármacos/compostos.

A análise da expressão de marcadores envolvidos na tumorigénese e progressão tumoral do CCR tanto para a linha LoVo como para a SW480 revelou que, os fármacos promoveram diferentes padrões de expressão de marcadores representativos de importantes eventos celulares na progressão tumoral. Isto está de acordo com o facto de que diferentes subtipos de CCR respondem de modo heterogéneo e que a mesma estratégia terapêutica nem sempre demonstra ser promissora no tratamento e prognóstico dos doentes com CCR. Considerando a disparidade nas respostas terapêuticas de ambas as linhas celulares, em junção com outros resultados obtidos em estudos semelhantes envolvendo a linha celular de CCR HT29 pelo Grupo de Gastrenterologia, os resultados apontam para a necessidade da adoção de estratégias terapêuticas mais personalizadas, i.e. mais orientadas para o subtipo de tumor. Neste contexto, tumores MSI com elevado potencial metastático, infiltração de células do sistema imunitário, mau prognóstico após recidiva, representados pela LoVo, poderão responder melhor ao irinotecano, e eventualmente ao GANT61, enquanto tumores MSS, com elevada sinalização TGF- β , elevada infiltração fibroblastos no microambiente tumoral, mau prognóstico, subtipo molecular CMS4, representados pela SW480, poderão responder melhor ao tratamento com azacitidina.

5 Bibliografia

- Albuquerque, C., Breukel, C., van der Luijt, R. *et al.* 2002. The “just-right” signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Human molecular genetics*:1549–60.
- Akhtar, R., Chandel, S., Sarotra, P. *et al.*, 2014. Current status of pharmacological treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*:177.
- André, T., Boni, C., Navarro, M., *et al.* 2009. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(19):3109–3116.
- Arnold, M., Sierra, M., Laversame, M., *et al.* 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4): 683–691.
- Aykan, N.F. 2015. Red meat and colorectal cancer. *Oncology Reviews*: 38–44.
- Le Bacquer, O., Shu, L., Marchand, M. *et al.*, 2011. TCF7L2 splice variants have distinct effects on β -cell turnover and function. *Human Molecular Genetics*, 20(10): 1906–1915.
- Bahrami, A., Foruuzan, A., ShahidAls, S., *et al.* 2017. Therapeutic Potential of Targeting Wnt/ β -Catenin Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(8): 1979–1983.
- Berg, K.C.G., Eide, P., Eilertsen, I.A., *et al.* 2017. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. , pp.1–16.
- Byrne, R.M. e Tsikitis, V.L. 2018. Colorectal polyposis and inherited colorectal cancer syndromes. *Annals of Gastroenterology*, 31(1): 24–34.
- Boland C. R., e Goel A. 2010. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6): 2073–2087.
- Cao, H.Z., Liu, X., Yang, W. *et al.*, 2017. LGR5 promotes cancer stem cell traits and chemoresistance in cervical cancer. *Cell death & disease*, 8(9): 3039.
- Carballal, S., Leoz, M. L., Moreira, L. *et al.* 2014. Hereditary colorectal cancer syndromes, *Colorectal Cancer*. Future Medicine Ltd London, UK , 3(1): 57–76.
- Chen, J., Yuan, T., Liu, M., *et al.* 2013. Association between TCF7L2 Gene Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(8): 6–11.
- Daly, M., Doreen Agnese, Kathleen Calzone, *et al.* 2017. Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®): Health Professional Version, PDQ Cancer Information Summaries. National Cancer Institute (US).

- Das, V., Kalita, J. e Pal, M. 2017. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87: 8–19. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064>.
- Davies, R.J., Miller, R. e Coleman, N. 2005. Colorectal cancer screening: Prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*, 5(3): 199–209.
- De Divitiis, C., Nasti, G., Montano, M. *et al.*, 2014. Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: Between hope and reality. *World Journal of Gastroenterology*, 20(41): 15049–15059.
- Dong, Y., Cao, A, Shi, J., *et al.* 2014. Tangeretin , a citrus polymethoxyflavonoid , induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways: 1788–1794.
- Duarte, M. 2015. Envolvimento de variantes genéticas específicas na suscetibilidade para o risco aumentado de cancro do cólon e reto e na agressividade tumoral. Escola Superior de Saúde Egas Moniz.
- Erzinger, M.M., Bovet, C., Hecht, K. *et al.*, 2016. Sulforaphane Preconditioning Sensitizes Human Colon Cancer Cells towards the: 1–17.
- Fearon, E.F. e Vogelstein, B. 1990. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61(1): 759–767.
- Francisco I., Albuquerque C., Lage P., *et al.* 2011. Familial colorectal cancer type X syndrome: two distinct molecular entities? *Fam Cancer*, 10(4): 623–31.
- Gao, T., Han, Y., Yu, L., *et al.* 2014. CCNA2 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer and tamoxifen resistance. *PLoS ONE*, 9(3):1–5.
- Guarinos, C., Sánchez-Fortún, C., Rodríguez-Soler, M., *et al.* 2012. Serrated polyposis syndrome : Molecular , pathological and clinical aspects. , 18(20): 2452–2461.
- Gilles, C., Newgreen, D.F., Sato, H., *et al.* 2005. Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: 4–6.
- Götze, K., Müller-Thomas, C., Peschel, C. 2009. The role of azacitidine in the management of myelodysplastic syndromes (MDS). *Cancer management and research*, 1: 119–130.
- Half, E., Bercovich, D. e Rozen, P. 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1): 1–23.
- Hansson, O., Zhou, Y., Renström, E., *et al.* 2010. Molecular function of TCF7L2: Consequences of TCF7L2 splicing for molecular function and risk for type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 10(6): 444–451.
- Hecht, A. e Stemmler, M.P., 2003. Identification of a Promoter-specific Transcriptional Activation

- Domain at the C Terminus of the Wnt Effector Protein T-cell Factor 4 *. , 278(6): 3776–3785.
- Hegde, M.R. e Roa, B.B. 2009. Genetic testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Current Protocols in Human Genetics*, (SUPPL. 61): 1–28.
- Herbst, A., Jurinovic, V., Krebs, S. *et al.*, 2014. Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt / β -catenin signaling: 1–15.
- Huang, S. *et al.* 2017. The emerging role of circular RNAs in transcriptome regulation. *Genomics*, 109(5–6): 401–407.
- Hisamuddin, I. M. and Yang, V. W. 2006. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview., *Current colorectal cancer reports*. NIH Public Access, 2(2): 53–59.
- Jasperson, K.W., Juohy, M. T., Neklason, W. D., *et al.*, Hereditary and Familial Colon Cancer. Disponivel em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3057468/pdf/nihms273465.pdf> [Acedido em: Agosto 8, 2018].
- Ji, Q., Zhang, C, Sun, X., *et al.* 2018. Circular RNAs function as competing endogenous RNAs in multiple types of cancer (Review): .23–30.
- Jin, T. 2016. Current Understanding on Role of the Wnt Signaling. *Endocrine Reviews*, 37(August): 254–277.
- Johnson, C.M., Wei, C., Ensor, E. J., *et al.* 2013. Meta-analyses of colorectal cancer risk factores. *Cancer causes control*, 24(6): 1207–1222.
- Jung, S., Yi, L., Kim, J., *et al.* 2011. The role of vimentin as a methylation biomarker for early diagnosis of cervical cancer. *Molecules and Cells*, 31(5): 405–411.
- Kim, E.R., Jeon, J., Lee J.H., *et al.* 2017. Clinical characteristics of patients with serrated polyposis syndrome in Korea : comparison with Western patients. , 15(3): 402–410.
- Krebs, A.M., Mitschke, J., Losada, M., *et al.* 2017. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology*, 19(5): 518–529.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., *et al.* 2015. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th edn. Philadelphia: Elsevier.
- Le Bacquer, O., Shu, L., Marchand, M., *et al.* 2011. TCF7L2 splice variants have distinct effects on β -cell turnover and function. *Human Molecular Genetics*, 20(10): 1906–1915.
- Leslie, A., Carey F.A., Pratt, N.R., *et al.* 2002. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*, 89(7): 845–860.
- Lin, Y., Wang, X., Yu, Y., *et al.* 2017. Expression and prognostic significance of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A in patients with resected gastric adenocarcinoma. *Oncology Letters*, 14(6): 7473–7482.

- Lindor, N. M. 2009. Familial Colorectal Cancer Type X, in *Genetics of Colorectal Cancer*. New York, NY: Springer New York: 183–186.
- Longley, D.B. e Johnston, P.G. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205(2): 275–292.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Diego, A., *et al.* 2017. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1).
- Massagué, J. 2008. TGF β in cancer. *Cell*, 134(2): 215–230. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.
- Mastrangelo, E. e Milani, M. 2018. Role and inhibition of GLI1 protein in cancer. *Lung Cancer (Auckland,N.Z.)*, 9, pp.35–43. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29628779>0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5877502.
- Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., *et al.* 2016. Doenças Oncológicas em Números 2015 - Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Lisboa.
- Mazumdar, T., DeVecchio, J., Agyeman, A., *et al.* 2011. Blocking hedgehog survival signaling at the level of the GLI genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 71(17): 5904–5914.
- Munker, S., Gerken, M., Fest, P., *et al.* 2018. Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects. *BMC Cancer*, 18(1): 1–9.
- Ngoi, S.M., Tovey, M.G. e Vella, A.T. 2008. Association of the TCF7L2 polymorphism with colorectal cancer and adenoma risk. *Journal of Immunology*, 181(9): 7670–7680.
- Nome, T., Hoff, A., Bakken, a., *et al.* 2014. High frequency of fusion transcripts involving TCF7L2 in colorectal cancer: Novel fusion partner and splice variants. *PLoS ONE*, 9(3): 1–8.
- Obuch, J.C. e Ahnen, D.J. 2016. Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything. *Gastroenterology Clinics of North America*, 45(3): 459–476. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2016.04.005>.
- Onuchic, J.N. e Levine, H. 2015. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. , 5(July), pp.1–19.
- Parbin, S., Kar, S., Shilpi, A., *et al.* 2013. Histone Deacetylases : A Saga of Perturbed Acetylation Homeostasis in Cancer. , 62(1).
- Pereira, L. 2016. Exploring the chemotherapeutic potential of Brassicaceae extracts in colorectal cancer cell spheroids.Faculda de ciência e tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

- Pereira, L.P., Silva, P., Duarte, M., *et al.* 2017. Targeting Colorectal Cancer Proliferation, Stemness and Metastatic Potential Using Brassicaceae Extracts Enriched in Isothiocyanates: A 3D Cell Model-Based Study.
- Pocasap, P. e Weerapreeyakul, N. 2016. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2): 119–124. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.11.003>.
- Richon, V.M. 2006. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor: 2–6.
- Sánchez-Tomé, E., Rivera, B., Perea, J. *et al.* 2015. Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. *Journal of Gastroenterology*, 50(6): 657–666.
- Silva, I., Estrada, M., Pereira, C., *et al.* 2018. Polymethoxylated Flavones from Orange Peels Inhibit Cell Proliferation in a 3D Cell Model of Human Colorectal Cancer Polymethoxylated Flavones from Orange Peels Inhibit Cell Proliferation: 5581
- Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., *et al.* 2017. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*: 8–20.
- de Sousa, E.M.F., Vermeulen, L., Richel, D. *et al.* 2011. Targeting Wnt Signaling in Colon Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*, 17(4): 647–653. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-10-1204>.
- Stintzing, S. 2014. Management of colorectal cancer.
- Tang, W., Dodge, M., Gundapaneni, D. *et al.* 2008. A genome-wide RNAi screen for Wnt / β -catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. , 105(28): 9697–9702.
- Tomimaru, Y., Xu, C., Nambotin, S. *et al.* 2014. Loss of exon 4 in a human T-cell factor-4 isoform promotes hepatic tumorigenicity. *Liver Int* . Author manuscript: 1536–1548.
- Tomita, N. 2018. Introduction: Lynch syndrome — its molecular mechanism and current topics. *International Journal of Clinical Oncology*, Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10147-018-1286-3>.
- Umar, A., Risinger, J. I., Hawk, E. T., *et al.* 2004. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer, *Nature Reviews Cancer*: 153–158
- Upadhyay, S., Dahal, S., Bhatt, V., *et al.* 2015. Chemotherapy use in stage III colon cancer: A National Cancer Database analysis. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7(5): 244–251.
- Veenstra, C.M. e Krauss, J.C. 2018. Emerging Systemic Therapies for Colorectal Cancer. *Clinics in*

- Valle L. 2014. Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol*, 20(29): 9828–49.
- Vidal, A.F., Ribeiro-dos-Santos, A., Vinasco-Sandoval, T, *et al.* 2017. The comprehensive expression analysis of circular RNAs in gastric cancer and its association with field cancerization. , (October): 1–8.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L. *et al.* 2017. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer* 2, 8: 761–773.
- Wang, X. De, Inzunza, H., Chang, H., *et al.* 2013. Mutations in the Hedgehog Pathway Genes SMO and PTCH1 in Human Gastric Tumors. *PLoS ONE*, 8(1): 1–8.
- Weise, A., Bruser, K., Elfert, S., *et al.* 2010. Alternative splicing of Tcf7l2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt / b - catenin targets. , 38(6): 1964–1981.
- Wells, K. e Wise, P. E. 2017. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes, *Surgical Clinics of North America*, 97(3): 605–625.
- Wu, C., Zhu, X., Liu, W., *et al.* 2017. Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer : function , mechanism , and therapy: 3249–3259.
- Wu, Y. e Zhou, B.P. 2010. More than EMT. *Cell Adhesion and Migration*, 4(June): 199–203.
- Xu, Z., Yan, Y., Zeng, S., *et al.* 2018. Circular RNAs : clinical relevance in cancer. , 9(1): 1444–1460.
- Yang, Y., Du, Y. e Liu, X., 2016. *Involvement of Non-coding RNAs in the Signaling Pathways of Colorectal Cancer.*
- Zambirinis, C.P. 2009. Undefined familial colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 1(1): 12.
- Zhang, L. shu e Lum, L. 2018. *Chemical Modulation of WNT Signaling in Cancer*, Elsevier Inc. Disponivel em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.008>.
- Zhong, Y., Du, Y., Yang, X., *et al.* 2018. Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression. *Molecular Cancer*, 17(1): 1–11.

6 Anexos

Anexo I: Preparação de soluções e reagentes usados na eletroforese em gel de agarose.

1. Preparação de TBE 1x

Diluir a solução TBE 10x (0,89M Tris Borato Ph 8,3 + 20mM Na₂ EDTA – *National Diagnostics*), em ddH₂O para um volume final de 2000 mL.

2. Preparação do gel de agarose 2% (p/v)

Adicionar 5g de agarose (*Seaken® LE Agarose – Lonza*) a 250 mL de TBE 1x num *Erlenmeyer* de 500mL. Dissolver a agarose num micro-ondas e deixar arrefecer um pouco. Adicionar 12,5µL de brometo de etídio (10mg/ml, *MP biomedical*s). Colocar a solução numa base de polimerização com 4 pentes de 30 poços à temperatura ambiente numa superfície protegida e ventilada (*hotte*). Armazenar a 4°C.

3. Preparação do gel de agarose 0,8% (p/v)

Adicionar 2g de agarose (*Seaken® LE Agarose – Lonza*) a 250 mL de TBE 1x num *Erlenmeyer* de 500mL. Dissolver a agarose num micro-ondas e deixar arrefecer um pouco. Adicionar 12,5µL de brometo de etídio (10mg/ml, *MP biomedical*s). Colocar a solução numa base de polimerização com 2 pentes de 20 poços à temperatura ambiente numa superfície protegida e ventilada (*hotte*). Armazenar a 4°C.

4. Preparação de Orange G 5x e 1x:

Orange 5x: a 12ml de *Ficoll (Sigma)* adicionar 125g de Orange G (*Sigma*) e 50mL de ddH₂O sob agitação, armazenar a -20°C.

Orange 1x: diluir a solução de Orange 5x para um volume final de 2mL em ddH₂O e armazenar a 4°C.

5. Preparação do marcador de peso molecular de *GeneRulerDNALadder50pb (ThermoFisher Scientific)*:

A 50µL de marcador *GeneRulerDNALadder50pb (ThermoFisher Scientific)* adicionar 250µL de Orange 5x para um volume final de 1mL em ddH₂O.

6. Preparação dos marcadores de peso molecular *Lambda/HindIII DNA Ladder (Fermentas)*:

A 20µL de *Lambda/HindIII DNA Ladder (Fermentas)* adicionar 100µL de Orange 5x para um volume final de 400µL em ddH₂O.

Anexo II: Programas de amplificação usados no decorrer deste estudo

Tabela II.1 - Programa de amplificação para reações de PCR usando o kit Biotaq™ (Bioline)

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	5 min	1
Desnaturação	94	50 s	35
Hibridação	Variável	30 s	
Elongação	72	50s	
Elongação final	72	7min	1
Pausa	15	∞	---

Tabela II.2 - Programa de amplificação para reações de PCR usando o kit Ampliqa Gold® (Applied Biosystems)

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	5 min	1
Desnaturação	94	50 s	40
Hibridação	Variável	30 s	
Elongação	70	50s	
Elongação final	70	7min	1
Pausa	15	∞	---

Tabela II.3 - Programa de reação de sequenciação para sequenciação de Sanger

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	96	5min	1
Desnaturação	95	10s	25
Hibridação	Variável	5s	
Elongação	60	4min	
Pausa	4	∞	---

Tabela II.4 - Programa de transcrição reversa para síntese de cDNA

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação e ligação de hexâmeros	70	10min	1
Pausa	10	∞	
Síntese de cDNA	42	60min	
Elongação	70	15min	
Pausa	4	∞	---

Tabela II.5 - Programa de amplificação para reações qPCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Incubação	50	2min	---
Ativação da polimerase	95	10min	---
Desnaturação	95	15s	40
Hibridação e elongação	60	1min	

Anexo III – Protocolo de precipitação e purificação de DNA para preparação de amostras para a sequenciação de *Sanger* após reação de sequenciação.

1. Protocolo:

Num tubo tipo *ependorf* de 2mL adicionar 2μL de EDTA (125mM), 2μL de acetato de sódio (3M) e 50μL de etanol por amostra. Homogeneizar em *vortex* e realizar um *spin-down*. De seguida, adicionar 54μL da solução em novos tubos tipo *ependorf* de 1,5mL juntamente com o volume total (20μL) da reação de sequenciação. Homogeneizar e incubar as amostras por um período de 15 minutos, à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugar a 14000rpm durante 30 minutos a 4°C. Após centrifugação remover cuidadosamente o sobrenadante e adicionar ao *pellet* obtido 100μL de etanol 70% (v/v). Homogeneizar e centrifugar as amostras a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante resultante e secar o *pellet* obtido a 37°C, durante 10 minutos de modo a remover resíduos de etanol. Armazenar os *pellets* a 4°C até à realização da sequenciação de *sanger*.

2. Soluções:

EDTA (125mM, pH 8): Dissolver 4,65g de EDTA a pH8 (ajustar utilizando NaOH) e preparar um volume final de 100mL em ddH₂O.

Acetato de sódio (3M, pH 4,5): Dissolver 24,8g de acetato de sódio em ddH₂O para um volume final de 100mL. De modo a ajustar o pH, usar ácido acético.

Etanol 70% (v/v): Adicionar 30mL de ddH₂O a 70mL de etanol absoluto e homogeneizar.

Anexo IV: *Primers* e condições usadas nas reação de PCR e qPCR.

Tabela IV.1 – Sequência e condições específicas dos primers utilizados na reação de qPCR para o estudo de genes de interesse no CCR nas linhas celulares de CCR LoVo e SW480.

Gene	Sequência do primer		Concentração dos Primers (pmol/μL)	Kít comercial
GAPDH	F	5'-TGCAACCACTGCTTAGC -3'	7,5	Power SYBR® Green PCR, Master Mix kit (Applied Biosystems)
	R	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'		
TCF7L2	F	5'-GCTGATGTCAAATCGTCTCTAGTCA -3'	5	Power SYBR® Green PCR, Master Mix kit (Applied Biosystems)
	R	5'-TCTTGGCCGCTTCTTCCA-3		
TCF7L2 (isoform 1-6)	F	5'-CCTCTCTAGATGTCTAACAAGTGC-3'	5	KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (KapaBiosystems)
	R	5'-CACACTTACCAAGCCGACGTA-3'		
BIRC5	F	5'-GACCAACCGCATCTCTACATTC-3'	5	Power SYBR® Green PCR, Master Mix kit (Applied Biosystems)
	R	5'-CTGGCTCGTTCTCAGTGGG-3'		
VIM	F	5'-GCTCAATGTAAAGATGGCCCTTG-3'	5	KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (KapaBiosystems)
	R	5'-AAGAGGCAGAGAAATCCTGCTC-3'		
LGR5	F	5'-GAGGATCTGGTGACCTGAGAA-3'	5	KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (KapaBiosystems)
	R	5'-CATAAGTGATGCTGGAGCTGGTAA-3'		
CDH1	F	5'-GATCCATTTCTTGGTCTACGCC-3'	5	Power SYBR® Green PCR, Master Mix kit (Applied Biosystems)
	R	5'-CTGCTTGGATTCCAGAAACGG-3'		
ABCB1	F	5'- GTTGTCTGGACAAGCACTGAAAG-3'	5	Power SYBR® Green PCR, Master Mix kit (Applied Biosystems)
	R	5'- GCTCCTGAGTCAAGAAACAACG-3'		
CDKN1A	F	5'- GGTGGACCTGGAGACTCTC-3'	5	Power SYBR® Green PCR, Master Mix kit (Applied Biosystems)
	R	5'- GTGGTAGAAATCTGTCACTGCTGG-3'		
CCNA2	F	5'- AAGAGGCAGAGAAATCCTGCTC-3'	5	KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (KapaBiosystems)
	R	5'- GTGCAACCCGCTCTGCTTTC-3'		

F – Primer forward 5'; R. Primer reverse 3

Tabela IV.2 – Condições de PCR, sequência e tamanho esperado dos primers usados para a amplificação dos polimorfismos do gene TCF7L2 analisados neste estudo utilizando o kit AmpliTaq Gold® (Thermofisher Scientific) e 40 ciclos.

Polimorfismos do gene TCF7L2	Sequência do Primer		Peso molecular do fragmento (pb)	MgCl ₂ (μL)	Temperatura de hibridação
rs3814570	F	5'-TGGCCTTGTCATCTCGG-3'	181	1,25	62°C
	R	5'-TTTTTCAGGGAAGGTGGGA-3'			
rs10885394	F	5'-TTGCTCTATCACCAGGAACA-3'	140	1,25	60°C
	R	5'-ATACCTGCCTCAAGCCCCAG-3'			
rs10885395	F	5'-CCACTCTACATTTAAAGAATC-3'	130	1,25	55°C
	R	5'-GTGGGACTTAACATTCATG-3'			
rs7901695	F	5'-GCAGTCACTCCTCATTTCTCT-3'	150	1	61°C
	R	5'-CGGTTCTCAAGGTTTCATCCA-3'			
rs7903146	F	5'-GGCTTTCTCTGCCTCAAAACC-3'	146	1	63,5°C
	R	5'-ACAGTTACAGGGAAGGCAAGT-3'			
rs11196205	F	5'-TGGGATAGACCCAGGACAA-3'	198	1	63°C
	R	5'-TTAGGCTTCTTTGGAGAGAGAC-3'			
rs12255372	F	5'-GGTCTGGCTTGGAAAGTGTA-3'	180	1	61°C
	R	5'-GACTCTCTTCTGAGTGCCAGAT-3'			

F – Primer forward 5'; R. Primer reverse 3

Tabela IV.3 – Condições de PCR e sequência dos primers usados para a amplificação de formas de circRNA do gene *TCF7L2* analisados neste estudo utilizando o kit Power SYBR® Green PCR, Master Mix (Applied Biosystems).

Fragmento do gene <i>TCF7L2</i>	Sequência do <i>Primer</i>		MgCl ₂ (μL)	Temperatura de hibridação	Número de ciclos
5-4	5F	5'-GACAAGCCCTCAAGGATG'-3'	1,25	54°C	35
	4R	5'-GAGTAATGTGTGCTGCCG-3'			
5-4 – INT4	5-4F	5'-GCACACATTGTCCTCCATT-3'	1,25	55°C	40
	INT4R	5'-CAAGAGACCTACATATAGAC-3'			
5-4 – 4	5-4F	5'-GCACACATTGTCCTCCATT-3'	1,25	55°C	30
	4R	5'-GCAATCTGGTGTCAATCG-3'			

Tabela IV.4 - Condições de PCR e sequência dos primers usados para a amplificação de formas de circRNA do gene *PROM1* analisados neste estudo utilizando o kit Power SYBR® Green PCR, Master Mix (Applied Biosystems).

Fragmento do gene <i>PROM1</i>	Sequência do <i>Primer</i>		MgCl ₂ (μL)	Temperatura de hibridação
5-4	5F	CGGAAACTGGCAGATAGCAAT	1	60°C
	4R	CAAATCACCAACAGGGAGA		
5-4 – 4	5-4F	TTCAAGGAACAAATGTGGTGG		
	4R	CAAATCACCAACAGGGAGA		

Tabela IV.5- Condições de PCR e sequência dos primers usados para a amplificação de formas de circRNA do gene *CD44* analisados neste estudo utilizando o kit Power SYBR® Green PCR, Master Mix (Applied Biosystems).

Fragmento do gene <i>CD44</i>	Sequência do <i>Primer</i>		MgCl ₂ (μL)	Temperatura de hibridação
2-1	2F	GCTACAGCATCTCTCGGACG	1	60°C
	1R	CGATCTGCGCCAGGCTCA		

Anexo V : Mutações descritas em linhas celulares CCR que são importantes no CCR.

Tabela VI.1 – Mutações descritas em genes críticos para o CCR e para genes que constituem marcadores de Stemness, TEP, apoptose, fase do ciclo celular e vias de sinalização chave.

	LoVo	HCT116	SW48	LS174T	HT29	SW480	SW620
TCF7L2	-	-	p.A139V	p.K462fs*2 3	-	-	-
BIRC5	-	-	-	-	-	p.E129K p.E152K	p.E129K p.E152K
VIM	-	-	p.L443L	-	-	-	-
LGR5	-	-	p.P415L	-	-	p.Q294Q p.V666A	p.Q294Q p.V666A
CDH1	-	-	-	-	-	p.A692A	p.A692A
ABCB1	-	p.D603H	-	-	-	p.G412G p.I1145I p.S893A	p.G412G p.I1145I p.S893A
CDKN1A (p21)	-	-	-	-	-	-	-
CCNA2	-	-	-	-	-	p.I163V	p.I163V
SNAI	-	-	-	-	-	-	-
CTNNBIP1	-	-	-	-	-	-	-
MMP9	-	-	-	-	-	p.Q279R p.R574P p.G607G p.R668Q p.V694V	p.Q279R p.R574P p.G607G p.R668Q p.V694V
MMP7	-	-	-	-	-	-	-
GLI1	-	-	p.P202P	-	-	p.G933D p.G805D p.G892D p.E151E p.E192E p.E64E p.E972Q p.E1059Q p.E1100Q	p.G933D p.G805D p.G892D p.E151E p.E192E p.E64E p.E972Q p.E1059Q p.E1100Q
AXI2	p.R538W	-	-	p.G665fs*2 4	-	p.P455P p.P462P p.P50S	p.P455P p.P462P p.P50S
PAK1	-	-	p.D178E	-	-	-	-
PROM1	-	-	p.D404N				
CD44	-	-	-	-	-	p.H85H p.K374R p.I436T	p.H85H p.K374R p.I436T
TP53	-	-	-	-	p.R273H	p.R273H p.P309S	p.R273H p.P309S
KRAS	p.G13D p.V14A	p.G13D	-	p.G12D		p.G12V	p.G12V
BRAF	-	-	p.R347X	p.D211G	p.T119 p.V600E	-	-
PIK3CA	-	p.H1047R	p.G914R	p.H1047R		-	-
PTEN	-	-	-			-	-
MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	MSS	MSS	MSS
CIMP	CIMP-	CIMP+	CIMP+	CIMP-	CIMP+	CIMP-	CIMP-

MSI – Instabilidade de microssatélites; MSS – Microssatélites estável; CIMP – Fénótipo metilador das ilhas CpG; CIMP+ – positivo; CIMP- – negativo.

Anexo VI: Fármacos e compostos naturais utilizados no tratamento das linhas celulares de CCR

Tabela VI.1 – Informações relativas aos fármacos e compostos naturais utilizados no decorrer deste estudo

		Modo de ação	Concentração do stock	Concentração max. utilizada no ensaio	Solvente
Fármacos	5-Fluorouracil	Antimetabolito (inibidor da <i>Thymidylate synthase</i>)	50mM	800µM	H ₂ O
	Oxaliplatina	Agente alquilante (inibidor da síntese de DNA)	12,5mM	800µM	H ₂ O
	Irinotecano	Inibidor de topoisomerase 1	34mM	800µM	H ₂ O
	Azacitidina	Agente hipometilante (inibidor metiltransferase DNA)	5mM	200µM	H ₂ O + DMSO
	Vorinoestato	Inibidor de histonas deacetilases	6mM	50µM	DMSO
	Gant61	Inibidor de GLI1 e GL2 (via de sinalização <i>Hedgehog</i>) inibidores de fatores de transcrição	5mM	200µM	ETOH
	Capmatinib	Inibidor do c-MET	2,5mM	25µM	DMSO
Nutraceuticos	Sulfurafano	Antioxidante	10mM	100µM	DMSO
	OPE	Antioxidante	150mg/ml	7,5mg/ml	ETOH

Anexo VII: Resultados da análise de polimorfismos do gene *TCF7L2*

Tabela VII.1 - Genótipo dos polimorfismos analisados, localizados na região upstream do exão 1, em tumores e respetiva mucosa normal de indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de Bethesda e indivíduos com CCR esporádico.

Amostra	rs38145570 (-2006 pb)*	rs10885394 (- 1728 pb)*	rs10885395 (- 1248 pb)*
	Alelo mais frequente:		
	Alelo C	Alelo T	Alelo C
CAS5	C/C	T/T	C/C
CAS6	C/C	T/T	C/C
CAS7	C/C	T/T	C/C
CAS8	C/C	T/T	C/C
CAS15	C/T	T/A	C/T
CAS16	C/T	T/A	C/T
CAS25	C/T	T/A	C/T
CAS26	C/T	T/A	C/T
CAS33	C/C	T/T	C/C
CAS34	C/C	T/T	C/C
CAS35	C/T	T/A	C/T
CAS36	C/T	T/A	C/T
CAS38	C/T	T/A	C/T
CAS45	C/C	T/T	C/C
CAS46	C/C	T/T	C/C
CAS49	C/T	T/A	C/T
CAS50	C/T	T/A	C/T
CAS53	C/C	T/T	C/C
CAS54	C/C	T/T	C/C
CAS57	C/C	T/T	C/C
CAS58	C/C	T/T	C/C
CAS65	C/C	T/T	C/C
CAS66	C/C	T/T	C/C
CAS69	C/T	T/A	C/T
CAS70	C/T	T/A	C/T
CAS139	C/T	T/A	C/T
CAS140	C/T	T/A	C/T
CAS155	C/C	T/T	C/C
CAS156	C/C	T/T	C/C
CAS157	C/C	T/T	C/C
CAS158	C/C	T/T	C/C
CAS169	C/T	T/A	C/T
CAS170	C/T	T/A	C/T
CAS171	C/C	T/T	C/C
CAS172	C/C	T/T	C/C
CAS173	C/C	T/T	C/C
CAS174	C/C	T/T	C/C
CAS182	C/T	T/A	C/T
CAS187	C/C	T/T	C/C
CAS188	C/C	T/T	C/C
CAS189	C/C	T/T	C/C
CAS190	C/C	T/T	C/C
CAS195	C/C	T/T	C/C
CAS196	C/C	T/T	C/C
L197	C/C	T/T	C/C
L197P	C/C	T/T	C/C
CAS201	C/C	T/T	C/C
CAS202	C/C	T/T	C/C
CAS203	C/C	T/T	C/C
CAS204	C/C	T/T	C/C
CAS227	C/C	T/T	C/C
CAS228	C/C	T/T	C/C

* - Posição relativa ao ATG. A cinzento encontram-se representados os resultados de heterozigotia para os polimorfismos, a preto homozigotia para o alelo mais frequente (normal) e a vermelho homozigotia para o polimorfismo. A sombreado encontram-se representados os resultados referentes às amostras de doentes com CCR esporádico. As letras a minúsculo representam um desequilíbrio alélico para a heterozigotia para o polimorfismo (ganho ou perda de um dos alelos, polimórfico ou normal).

(continuação da tabela anterior)

CAS233	C/C	T/T	C/C
CAS234	C/C	T/T	C/C
CAS235	C/C	T/T	C/C
CAS236	C/C	T/T	C/C
CAS253	C/T	T/A	C/T
CAS254	C/T	T/A	C/T
CAS256	C/T	T/A	C/T
CAS295	C/C	T/T	C/C
CAS296	C/C	T/T	C/C
CAS297	C/T	T/A	C/T
CAS298	C/T	T/A	C/T
CAS302	C/C	T/T	C/C
CAS303	C/C	T/T	C/C
CAS304	C/C	T/T	C/C
CAS305	T/T	A/A	T/T
CAS306	T/T	A/A	T/T
CAS319	C/T	T/A	C/T
CAS320	C/T	T/A	C/T
CAS321	C/C	T/T	C/C
CAS322	C/C	T/T	C/C
CAS347	C/C	T/T	C/C
CAS348	C/C	T/T	C/C
CAS359	C/C	T/T	C/C
CAS360	C/C	T/T	C/C
CAS373	C/C	T/T	C/C
CAS374	C/C	T/T	C/C
CAS383	C/C	T/T	C/C
CAS384	C/C	T/T	C/C
CAS385	T/T	A/A	T/T
CAS386	T/T	A/A	T/T
CAS387	C/C	T/T	C/C
CAS388	C/C	T/T	C/C
CAS389	C/C	T/T	C/C
CAS390	C/C	T/T	C/C
CAS439	C/T	T/A	C/T
CAS440	C/T	T/A	C/T
CAS456	C/A	T/T	C/C
CAS472	C/T	T/A	C/T
CAS480	C/T	T/A	C/T
CAS490	C/T	T/A	C/T
CAS505	C/C	T/T	C/C
CAS506	C/C	T/T	C/C
CAS519	C/T	T/A	C/T
CAS520	C/T	T/A	C/T
CAS523	C/C	T/T	C/C
CAS524	C/C	T/T	C/C
CAS529	C/C	T/T	C/C
CAS530	C/C	T/T	C/C
CAS537	C/C	T/T	C/C
CAS538	C/C	T/T	C/C
CAS559	C/C	T/T	C/C
CAS560	C/C	T/T	C/C
CAS573	C/C	T/T	C/C
CAS574	C/C	T/T	C/C
CAS586	C/C	T/T	C/C
CAS595	C/C	T/T	C/C

(continuação da tabela anterior)

CAS596	C/C	T/T	C/C
CAS604	C/T	T/A	C/T
CAS611	C/C	T/T	C/C
CAS612	C/C	T/T	C/C
CAS623	C/C	T/T	C/C
CAS624	C/C	T/T	C/C
CAS627	C/C	T/T	C/C
CAS628	C/C	T/T	C/C
CAS645	C/C	T/T	C/C
CAS646	C/C	T/T	C/C
CAS655	C/C	T/T	C/C
CAS656	C/C	T/T	C/C
CAS673	C/C	T/T	C/C
CAS674S	C/C	T/T	C/C
CAS677	C/C	T/T	C/C
CAS678	C/C	T/T	C/C
CAS703P	C/C	T/T	C/C
CAS704	C/C	T/T	C/C
CAS705	C/C	T/T	C/C
CAS706	C/C	T/T	C/C
CAS713	C/T	T/A	C/T
CAS714	C/T	T/A	C/T
CAS719	C/C	T/T	C/C
CAS731	C/C	T/T	C/C
CAS732	C/C	T/T	C/C
CAS733	C/C	T/T	C/C
CAS734	C/C	T/T	C/C
CAS777	C/C	T/T	C/C
CAS778	C/C	T/T	C/C
CAS785	C/C	T/T	C/C
CAS815	C/C	T/T	C/C
CAS816S	C/C	T/T	C/C
CAS818	C/T	T/A	C/T
CAS835	C/C	T/T	C/C
CAS836	C/C	T/T	C/C
CAS850	C/C	T/T	C/C
CAS877	C/C	T/T	C/C
CAS878	C/C	T/T	C/C
CAS1083	C/T	T/A	C/T
CAS1084	C/T	T/A	C/T
CAS1155	C/C	T/T	C/C
CAS1156S	C/C	T/T	C/C
CAS1183	C/T	T/A	C/T
CAS1184S	C/T	T/A	C/T
CAS1197	T/T	A/A	T/T
CAS1198	T/T	A/A	T/T
CAS1199	C/C	T/T	C/C
CAS1200	C/C	T/T	C/C
CAS1211	C/C	T/T	C/C
CAS1212	C/C	T/T	C/C
CAS1233	C/C	T/T	C/C
CAS1234	C/C	T/T	C/C
Cas1285	C/C	T/T	C/C
CAS1286S	C/C	T/T	C/C
CAS1529	C/C	T/T	C/C
CAS1530	C/C	T/T	C/C

(continuação da tabela anterior)

CAS1639	C/C	T/T	C/C
CAS1654	C/T	T/T	C/C
CAS1705	C/C	T/T	C/C
CAS1706	C/C	T/T	C/C
CAS1707	C/C	T/T	C/C
CAS1878	C/T	T/A	C/T
CAS1899	C/C	T/T	C/C
CAS1900	C/C	T/T	C/C
CAS1911	C/T	T/A	C/T
CAS1912	C/T	T/A	C/T
CAS1915	C/C	T/T	C/C
CAS1916	C/C	T/T	C/C
CAS1929	C/C	T/T	C/C
CAS1930	C/C	T/T	C/C
CAS1935	C/C	T/T	C/C
CAS1937	C/C	T/T	C/C
CAS1938	C/C	T/T	C/C
CAS1953	C/C	T/T	C/C
CAS1954	C/C	T/T	C/C
CAS1969	C/T	T/A	C/T
CAS1970S	C/T	T/A	C/T
CAS1971	C/C	T/T	C/C
CAS1972S	C/C	T/T	C/C
CAS1977	C/C	T/T	C/C
CAS1978S	C/C	T/T	C/C
CAS1983	C/T	T/A	C/T
CAS1984	C/T	T/A	C/T
CAS1987	C/C	T/T	C/C
CAS2011	C/C	T/T	C/C
CAS2012	C/C	T/T	C/C
CAS2017	C/C	T/T	C/C
CAS2018	C/C	T/T	C/C
CAS2031	T/T	A/A	T/T
CAS2032	T/T	A/A	T/T
CAS2043	C/C	T/T	C/C
CAS2044	C/C	T/T	C/C
CAS2053	C/C	T/T	C/C
CAS2054	C/C	T/T	C/C
CAS2057	T/T	A/A	T/T
CAS2058	T/T	A/A	T/T
CAS2059	C/C	T/T	C/C
CAS2060S	C/C	T/T	C/C
CAS2093	C/T	T/A	C/T
CAS2115	C/C	T/T	C/C
CAS2116	C/C	T/T	C/C
CAS2155	C/C	T/T	C/C
CAS2156	C/C	T/T	C/C
CAS2159	C/C	T/T	C/C
CAS2160S	C/C	T/T	C/C
CAS2187	C/C	T/T	C/C
CAS2188S	C/C	T/T	C/C
CAS2197	C/T	T/A	C/T
CAS2203	C/C	T/T	C/C
CAS2204S	C/C	T/T	C/C
CAS2209	C/T	T/A	C/T
CAS2210	C/T	T/A	C/T
CAS2229	C/C	T/T	C/C
CAS2241	C/C	T/T	C/C
CAS2242	C/C	T/T	C/C
CAS2456	C/C	T/T	C/C
CAS2817	C/C	T/T	C/C
CAS2818S	C/C	T/T	C/C
CAS2913	C/C	T/T	C/C
CAS3247	C/C	T/T	C/C
CAS3248	C/C	T/T	C/C
CAS3253	C/T	T/A	C/T
CAS3254	C/T	T/A	C/T
CAS3291	C/T	T/A	C/T
CAS3292	C/T	T/A	C/T

Tabela VII.2 - Genótipo dos polimorfismos analisados do gene TCF7L2, localizados na região upstream do exão 1, em indivíduos controle da população portuguesa.

Amostra	rs38145570	rs10885394	rs10885395
	Alelo normal:		
	C	T	C
23146	C/C	T/T	C/C
23176	C/C	T/T	C/C
23442	C/C	T/T	C/C
23444	C/T	T/A	C/T
37990	C/T	T/A	C/T
38014	T/T	A/A	T/T
38062	C/C	T/T	C/C
41734	C/C	T/T	C/C
41758	C/T	T/A	C/T
42386	C/T	T/A	C/T
43955	C/T	T/A	C/T
44011	C/C	T/T	C/C
46083	T/T	A/A	T/T
46131	T/T	A/A	T/T
51400	T/T	A/A	T/T
52701	C/C	T/T	C/C
58290	C/C	T/T	C/C
59508	C/C	T/T	C/C
60562	T/T	A/A	T/T
60564	C/T	T/A	C/T
60590	C/T	T/A	C/T
67290	C/C	T/T	C/C
69521	C/C	T/T	C/C
69523	C/T	T/A	C/T
73476	C/T	T/A	C/T
739821	C/T	T/A	C/T
74020	C/C	T/T	C/C
74023	C/T	T/A	C/T
74530	C/C	T/T	C/C
75915	C/C	T/T	C/C
76246	C/C	T/T	C/C
76281	C/T	T/A	C/T
76322	C/T	T/A	C/T
76329	C/C	T/T	C/C
77901	C/C	T/T	C/C
79067	C/T	T/A	C/T
79875	C/C	T/T	C/C
79884	C/T	T/A	C/T
81716	C/T	T/A	C/T
83333	C/C	T/T	C/C
84288	C/C	T/T	C/C
84324	C/T	T/A	C/T
84334	C/C	T/T	C/C
84353	C/C	T/T	C/C
84356	C/T	T/A	C/T
84744	C/C	T/T	C/C
84775	C/C	T/T	C/C
84799	C/C	T/T	C/C
84908	C/C	T/T	C/C
84948	C/T	T/A	C/T

Tabela VII.6.1 – Genótipo obtido para os polimorfismos analisados, localizados na região upstream do exão 1 e nos intrões 4 e 5, em indivíduos index de famílias FCCTX ou FCCTX-like (critérios Bethesda 4 5).

Amostra	Upstream exão 1			Intrão 4		Intrão 5	
	rs3814570	rs10885394	rs10885395	rs7901695	rs7903146	rs11196205	rs12255372
	Alelo mais frequente:						
	C	T	C	T	C	G	G
L408	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/T
L5	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G	G/G
L295	C/T	T/A	C/T	T/T	C/C	G/G	G/G
L1368	C/T	T/A	C/T	T/T	C/C	G/C	G/G
L1908	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G	G/G
L2161	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
L287	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	C/C	G/T
CAS1964s	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G	G/G
L2127	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/G
L2128	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/T
L1667	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
L782	C/C	T/T	C/C	T/C	C/T	G/C	G/T
L2156	C/T	T/A	C/T	T/C	T/T	C/C	G/T
L2170	C/T	T/A	C/T	C/C	T/T	C/C	T/T
L2180	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/C	G/G
L2185	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
L2186	T/T	A/A	T/T	T/T	C/C	G/C	G/G
L2195	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T
L2410	C/T	T/A	C/T	T/C	C/T	G/C	G/T
CAS1974s	C/T	T/A	C/T	C/C	T/T	C/C	T/T

Anexo VIII: Resultados prévios obtidos pelo grupo de Gastroenterologia da UIMP

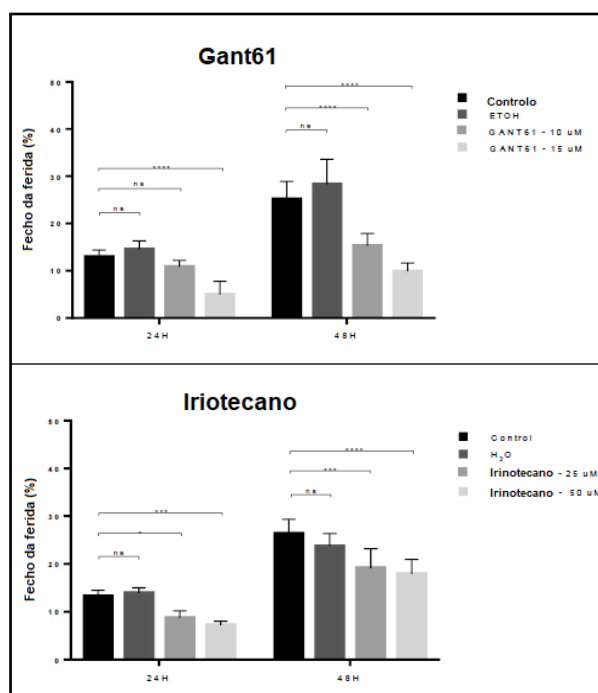


Figura VIII.1 - Ensaio de migração celular (wound healing assay) na linha celular de CCR HT29 após tratamento com (A) – Gant61, (B) – Irinotecano. A percentagem (%) de fecho foi calculada em relação à área inicial do risco às 0h.

Controlo – células HT29 sem tratamento; H₂O – células incubadas com a percentagem máxima de solvente utilizada (H₂O) no ensaio, i.e. com volume de solvente equivalente ao utilizado na maior concentração de composto.

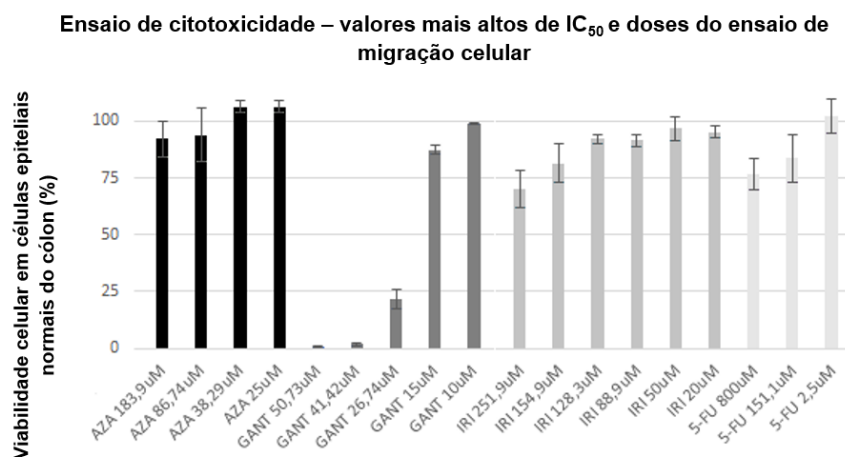


Figura VIII.2 – Ensaios de citotoxicidade na linha celular de cólon normal CCD 841, após tratamento com os valores de IC₅₀ e doses utilizadas em ensaios de migração celular (wound healing assay) para os fármacos Azacitidina, GANT61, Irinotecano e 5-FU obtidos previamente para linhas celulares de CCR

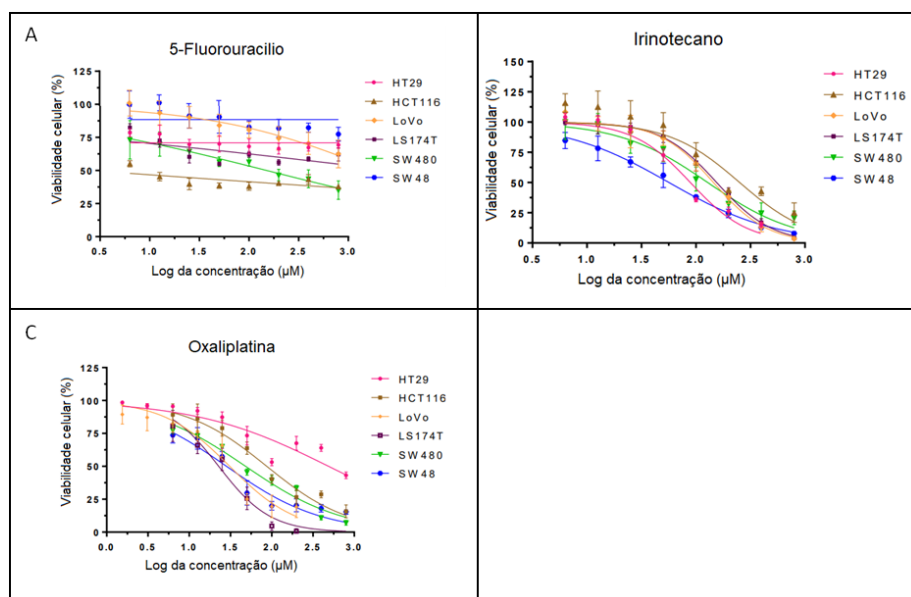


Figura VIII.3 - Representação esquemática do efeito de compostos citostáticos na viabilidade celular das linhas de CCR HT29, HCT116, LoVo, LS174T, SW480 e SW48. (A) – 5-Fluorouracil, (B) – Irinotecano, (C) – Oxaliplatin

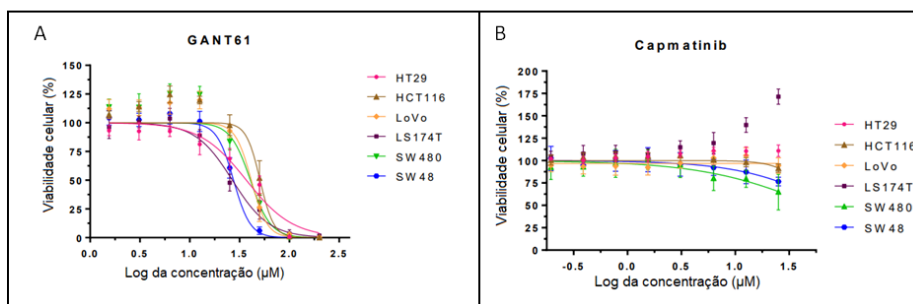


Figura VIII.4 - Representação esquemática do efeito de moduladores específicos de vias de sinalização na viabilidade celular das linhas de CCR HT29, HCT116, LoVo, LS174T, SW480 e SW48. (A) – GANT61, (B) – Caomatinib,

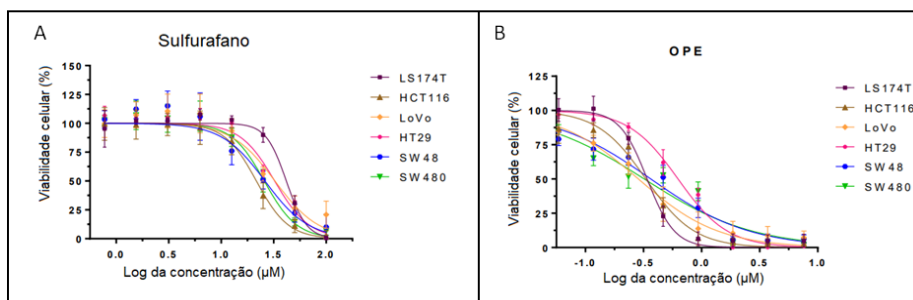


Figura VIII.5 - Representação esquemática do efeito de nutracêuticos na viabilidade celular das linhas de CCR HT29, HCT116, LoVo, LS174T, SW480 e SW48. (A) – Sulfurafano, (B) – OPE.

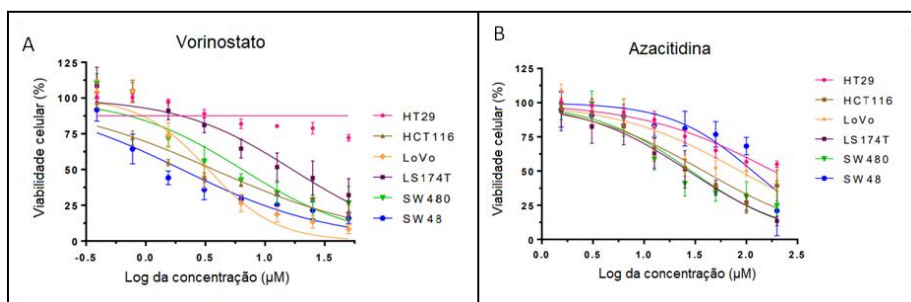


Figura VIII.7 - Representação esquemática do efeito de Inibidores de histona desacetilase e de DNA metiltransferase na viabilidade celular das linhas de CCR HT29, HCT116, LoVo, LS174T, SW480 e SW48. (A) – Sulfurafano, (B) – OPE.